

**Marcelo Andrés Umsza Guez**

**Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicaseudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo**

**Marcelo Andrés Umsza Guez**

**Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicaseudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo**

**Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes**

**São José do Rio Preto  
-2009-**

Umsza Guez, Marcelo Andrés.

Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo / Marcelo Andrés Marcelo Andrés. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

106 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Co-orientador: Eleni Gomes

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas - Aplicações industriais. 3. Enzimas de fungos - Produção. 4. Fungos termofílicos. 5. Biorreatores. 6. Fermentação. I. Thoméo, João Cláudio. II. Gomes, Eleni. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 663.15

“Feliz aquele que  
transfere o que sabe, e  
aprende o que ensina”

“O saber se aprende com  
os mestres. A sabedoria,  
só com o corriqueiro da  
vida”

## **AGRADECIMENTOS**

A mi familia, que siempre apoyaron mis decisiones – a mis padres por el ejemplo de batalla y superación, a mis hermanos, sobrinos y cuñados, por el incentivo de siempre.

À minha orientadora Profa. Eleni Gomes, pela confiança, pelas várias oportunidades de crescimento profissional oferecidas, pela amizade.

Ao meu Orientador Prof. João Cláudio Thoméo, pela amizade, paciência, dedicação e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Roberto da Silva, pelos conselhos e ajudas.

À Nati (baixinha), pela amizade, cumplicidade e pela valiosa ajuda em todos os momentos.

Aos meus amigos Mauricio, Fernanda e Michelle, pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório, Aline, Nati, Dani, Andréia, Fabi, Rodrigo, Ellen Lago, Carol, Érika, Carol Hein, Hamilton, Tássia, Rosângela, Milla, Ana Flavia, Márcia, Paula, Helô, Ricardo, Denise, Ana Lúcia, Rebeca pelo convívio diário no laboratório. Um agradecimento especial aos meus colegas do dia a dia, pelos momentos de descontração e alegria de sempre.

À Carmen Laurentino, César, Alex e Fernanda pela ajuda com o reator.

À Luciane e família, pela ajuda e carinho recebidos.

A mis amigos y Profesores de Cádiz – España, por la amistad y la oportunidad de trabajar juntos. Agradecimiento especial para Ana Díaz, por la sincera e incondicional amistad, “guanaca, que buenos tiempos!!!”.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, especialmente à Rosemar pela ajuda recebida.

A todos aqueles que torceram pelo meu trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa e o apoio financeiro.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a produção de pectinases pelo microrganismo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação em estado sólido (FES), em escala de frascos e em biorreator de bancada em leito fixo. Nas fermentações feitas foi utilizado substrato composto por uma mistura de bagaço de laranja, farelo de trigo e bagaço de cana, na proporção 40:40:20 (peso). Depois de obtidas as condições ideais de produção em escala de frascos (45 °C e 70% de umidade), foi feita a comparação do perfil de exopectinase do extrato bruto produzido em escala de frasco e em reator. A exo-PG apresentou temperatura ótima de atividade 60 °C e pH ótimo 4,5. Foi verificado que a maior produção de exo-PG em escala de frasco ocorreu nos tempos de 24 h (86,4 U/g) e 120 h (88,9U/g), sendo o tempo de 24 horas adotado para a realização das fermentações no biorreator de bancada. Em relação à estabilidade frente à temperatura e pH, a exo-PG manteve atividade acima de 60 % na faixa de pH testado (3,0-10,5) e manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora nas temperaturas de até 50 °C, decrescendo para cerca de 80% na temperatura de 60 °C. A máxima produção de endo-PG de 1374 U/g foi no tempo 144h. Também foi realizada a caracterização da endopectinase obtida na fermentação em frasco, verificando-se pH e temperaturas ótimos de 5,5 e 60 °C, respectivamente. A enzima apresentou estabilidade satisfatória entre os pHs a 3,0 e 6,0 e entre as temperaturas de 45 a 65 °C. No extrato enzimático bruto, além da presença de exo e endo PG, foi verificada a presença de xilanase, amilase, CMCase, avicelase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. De forma geral, a atividade da exo-pectinase foi afetada negativamente pelos íons  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ , detergente SDS, EDTA e outros aditivos, e potencializada pela presença de cátions bivalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ ). No extrato bruto não foi constatada a presença das micotoxinas aflatoxina, ocratoxina e zearalenona. No biorreator foram testadas as influências das variáveis: vazão, temperatura e umidade do ar de entrada, temperatura da parede do reator e arquitetura do equipamento sobre a produção das poligalacturonases. Pode-se verificar que a melhor condição de fermentação foi de temperatura 45 °C, tanto para a temperatura de entrada do ar como para a da parede, vazão de ar 120 L/h e 95% de umidade do ar. Posteriormente foram adicionados dois novos módulos à arquitetura do reator e foram testadas duas formas de aeração do leito, uma denominada longitudinal, na qual o ar foi introduzido na base do leito, e outra, denominada radial, na qual o gás foi introduzido através de um tubo perfurado colocado no eixo longitudinal do fermentador. A produção máxima alcançada no biorreator, 283 U/g (aeração longitudinal). A correção da

atividade da exopectinase (301 U/g) obtida em escala de frasco mostrou que houve uma ligeira maior produção nesta escala quando comparada com o biorreator. A inserção de bagaço de cana umidificado, sem inóculo, abaixo e acima do meio fermentativo, favoreceu a manutenção da umidade uniforme no leito fermentativo em níveis próximos aos do início do processo fermentativo. Em relação ao comportamento térmico do leito, foi observada elevação discreta, cerca de 3 °C, da temperatura ao longo do processo fermentativo. Foram testados diferentes modos de inserção dos termopares no meio, sem que as temperaturas medidas tenham sido fortemente afetadas. A produção enzimática com aeração longitudinal foi maior que com aeração radial.



## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the pectinases production with the thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in Solid State Fermentation (SSF), in flask scale and in a fixed bed bioreactor. The substrate was a mixture of wheat bran, orange bagasse and sugar cane bagasse (40:40:20%). When the optimal conditions of production of exo-Pg in flask scale were obtained (45°C e 70% of moisture) the crude enzyme extract profile from both flask and reactor tests were compared. Exo-Pg showed optimal activity at 60°C and pH 4.5. The higher production of exo-PG in flask scale occurred at 24 h (86.4 U / g) and 120 h (88.9U/g), and 24h was applied for the bioreactor experiments. Regarding to the stability to pH and temperature, exo-Pg preserved activity above 60% of its original value for the tested pH range (3-10.5) and 100% when kept during 1 hour at 25, 40 and 50 ° C, decreasing to nearly 80% at 60 °C. The higher production of endo-PG was 1374 U/g at 144h. Endo-Pg profile from flask tests was also characterized, and the optimal temperature and pH were 60 °C and 5.5, respectively. Endo-Pg showed good stability between pH 3.0 to 6.0 and temperature 45 to 65 °C. In the crude extract was also noticed xylamase, amylase, CMCase, avicelase, manganese peroxidase and lignin peroxidase. Exo-pectinase activity was adversely affected by Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> ions, detergent SDS, EDTA and other additives, and high activities were observed for divalent cations (Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup>). It was not detected the presence of the mycotoxins as aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in the crude extract. In the bioreactor were tested the influence of variable flow rate, temperature and humidity of incoming air, temperature of the reactor wall and architecture of the equipment on polygalacturonases production. The best operational condition for the bioreactor tests temperature 45 °C (air inlet temperature and wall temperature) air flow rate of 120 L / h and air relative humidity 95%. Were subsequently added two new modules to the architecture of the reactor and were tested two types of aeration of the bed, a longitudinal, in which the air was introduced at the base of bed, and another, called radial, in which the gas was introduced through a perforated tube placed in the longitudinal axis of the fermentor. In these two new modules was added humidified sugar cane bagasse. Maximum exo-PG production in bioreactor was 283 U/g, very close to best glass flasks results. The correction of exopectinase activity (301 U/g) obtained in flask scale showed that there was a slightly higher production when compared with the bioreactor. The higher temperature for the fermentation tests in the reactor were about 3°C above the initial temperature, 45°C. The thermocouples insertion techniques used did not present high influence over the thermocouple readings. Exo-PG production was higher when the longitudinal aeration was used. The insertion of humidified sugar cane bagasse

below and above the fermentation media favored the maintenance of uniform bed moisture content.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>05</b>
2.1. Enzimas de origem microbiana.....	05
2.2. Fermentação no Estado Sólido (FES).....	07
2.3. Vantagens e desvantagens da FES.....	10
2.4. Matérias-primas empregadas na FES.....	11
2.5. Importância da água no metabolismo fúngico durante a FES.....	13
2.6. Reatores utilizados em FES.....	16
2.6.1. Reatores de leito móvel.....	18
2.6.2. Reatores de leito fixo.....	18
2.7. Substâncias pécnicas.....	20
2.8. Enzimas pectinolíticas.....	21
2.9. Microrganismos termofílicos e produção de pectinases termoestáveis..	24
2.10. Aplicação de pectinases microbianas.....	27
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Microrganismo.....	31
4.2. Meios de cultivo..	31
4.2.1. Meio nutriente .....	31
4.2.2. Meio para manutenção da cultura.....	32
4.2.3. Temperatura ótima de crescimento do fungo.....	32

4.2.4. Meio para processo fermentativo.....	32
<b>4.3. Processo fermentativo em frasco erlenmeyer.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. Medida da atividade de poligalacturonases (PG).....</b>	<b>33</b>
<b>4.5. Medida da atividade de Xilanase.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6. Medida da atividade de Avicelase e CMCase.....</b>	<b>34</b>
<b>4.7. Medida da atividade Amilase.....</b>	<b>34</b>
<b>4.8. Medida de Manganês peroxidase.....</b>	<b>34</b>
<b>4.9. Medida de Lignina peroxidase.....</b>	<b>35</b>
<b>4.10. Avaliação da presença de micotoxinas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.11. Caracterização da exo-poligalacturonase do extrato bruto produzido em fermentação em erlenmeyer e em fermentador de bancada.....</b>	<b>36</b>
4.11.1. Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima.....	36
4.11.2. Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH.....	36
4.11.3. Estabilidade da exo-PG a 60°C na ausência de substrato.....	36
<b>4.12. Caracterização físico-química da Endo-poligalacturonase.....</b>	<b>37</b>
<b>4.13. Estudo do efeito de diferentes compostos sobre a atividade da exo-poligalacturonase.....</b>	<b>37</b>
4.14. Fermentador de leite fixo.....	37
<b>4.15. Preparação do substrato para fermentação.....</b>	<b>40</b>
<b>4.16. Processo fermentativo em reator de bancada.....</b>	<b>41</b>
4.17. Processos fermentativos complementares.....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1. Escolha do fungo para a FES.....	43

<b>5.2. Determinação de temperatura ótima de crescimento do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N 31 em meio sólido.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3. Produção de exo-PG em FES pelo fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N 31, em diferentes umidades.....</b>	<b>44</b>
<b>5.4. Estudo do perfil de produção de outras enzimas despolimerizantes.....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Caracterização Bioquímica da exo-PG produzida em fermentação em erlenmeyer .....</b>	<b>52</b>
5.5.1 Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade da exo-PG, e estabilidade da PG frente à variação de pH e temperatura.....	52
5.5.2. Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de endo-PG, e estabilidade da endo-PG frente à variação de pH e temperatura.....	54
<b>5.6. Efeitos de diferentes compostos na atividade enzimática da exo-PG.....</b>	<b>57</b>
<b>5.7.. Análise da presença de micotoxinas.....</b>	<b>59</b>
<b>5.8.. Reator de bancada – Testes preliminares.....</b>	<b>59</b>
5.8.1. Aquecimento do ar e umidificação do ar.....	59
5.8.2. Fermentação em reator e bancada.....	60
<b>5.9. Ensaio com umidade relativa do ar de 95%.....</b>	<b>65</b>
5.9.1. Perfil enzimático e de umidade.....	65
5.10. Perfil de temperatura das fermentações realizadas em diferentes condições de processo.....	73
5.11. Perfil de produção enzimática e de umidade em condições modificadas do fermentador.....	77
5.12. Comparação das características físico químicas da exo-PG produzida no reator e em frascos.....	84

<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>7. SUGESTÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Produção anual de enzimas aplicadas a processos industriais .....	01
<b>Figura 2.1.</b> Estrutura primária de substâncias pécticas.....	20
<b>Figura 4.1.</b> Diagrama geral do biorreator de leito fixo.....	38
<b>Figura 4.2.</b> Biorreator de bancada utilizado na FES.....	38
<b>Figura 4.3.</b> Esquema de localização de termopares e de distribuição de seqüência de amostragem do meio poroso. Ensaio com aeração longitudinal e radial .....	40
<b>Figura 5.1.</b> Crescimento do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em diferentes temperaturas.....	44
<b>Figura 5.2.</b> Produção de exopectinase pelo fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em diferentes umidades.....	45
<b>Figura 5.3.</b> Perfis de produção de enzimas por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em FES.....	48
<b>Figura 5.4.</b> Perfil de produção de endo-PG por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em FES.....	49
<b>Figura 5.5.</b> Caracterização físico-química da exo-PG produzida em erlenmeyer ...	53
<b>Figura 5.6.</b> Caracterização físico-química da endo-PG produzida em frascos erlenmeyer. a) Efeito do pH; b) Efeito da temperatura; c) Efeito do pH na ausência de substrato sobre a estabilidade da endo-PG; d) Efeito da temperatura na ausência de substrato sobre a estabilidade da endo-PG.....	55
<b>Figura 5.7.</b> Perfil enzimático e umidade na fermentação a 45 °C, 70% de umidade do meio e 70% umidade do ar de entrada.....	62
<b>Figura 5.8.</b> Aparência do substrato após fermentação no reator de bancada.....	64
<b>Figura 5.9.</b> Perfil enzimático e de umidade do meio para fermentações nas condições descritas .....	66
<b>Figura 5.10.</b> Perfil enzimático e de umidade do meio para fermentações nas condições descritas.....	67

<b>Figura 5.11.</b> a) Aparência das 12 amostras (3 de cada módulo) após fermentação de 24 horas, b) aparência do leite fermentativo após 24 horas fermentação.....	69
<b>Figura 5.12.</b> Perfil enzimático e de umidade para fermentação nas condições para Tar 120 °C, Tc 50 °C e vazão de ar 120L/h.....	71
<b>Figura 5.13.</b> Perfis térmicos nas condições Tcamisa – Tar – vazão L/h a) 45-40-60, b) 45-45-60, c) 45-40-120, d) 45-45-120, e) 45-40-180 e f) 45-45-180.....	74
<b>Figura 5.14.</b> Perfis de temperatura no reator para Tar= 45°C; Tc= 45°C; e G= 180 L/h; a) fermentação, (b) ensaio abiótico.....	76
<b>Figura 5.15.</b> Perfil de atividade enzimática e de umidade em fermentação em reator de bancada a 45 °C, 70% umidade e 120L/h de vazão de ar. a) Fermentação com aeração longitudinal, b) Fermentação com aeração radial.....	78
<b>Figura 5.16..</b> Perfil de umidade da fermentação de reator em bancada nas condições de 45 °C, 70% umidade e vazão de 120L/h.....	79
<b>Figura 5.17.</b> Perfil de umidade (a) e de atividade enzimática (b) durante fermentação em reator de bancada nas condições de 45 °C, 70% umidade.....	80
<b>Figura 5.18.</b> Perfil de temperatura da FES em biorreator de bancada; a) aeração ascendente e termopares dispostos de forma radial; b). aeração ascendente e termopares dispostos de forma axial (20 cm de altura); <b>c).</b> aeração centralizada e termopares dispostos radialmente; <b>d)</b> aeração centralizada e termopares dispostos radialmente (48 horas).....	82
<b>Figura 5.19.</b> Características físico-químicas da exopectinase produzida em reator de bancada e em frascos.....	85
<b>Figura 5.20.</b> Curva de calibração da produção enzimática em frascos erlenmeyer em função ao volume de extração.....	87



## LISTA TABELAS

<b>Tabela 2. 1.</b> Exemplos de produtos produzidos utilizando diferentes substratos em FES.....	08
<b>Tabela 2.2.</b> Exemplos de produtos produzidos utilizando diferentes suportes inertes em FES.....	09
<b>Tabela 2.3.</b> Comparação da produção de diferentes enzimas através da FES e FSm.....	10
<b>Tabela 2.4.</b> Exemplo de metabólitos produzidos em diferentes $a_a$ ou umidade relativa.....	14
<b>Tabela 2.5.</b> Exemplos de enzimas comerciais contendo pectinas, aplicadas em diferentes processamentos de frutas.....	28
<b>Tabela 4.1.</b> Planejamento dos experimentos de fermentação.....	41
<b>Tabela 5.1.</b> Metabólitos produzidos em FES utilizando diferentes biomateriais como substratos das FES.....	51
<b>Tabela 5.2.</b> Efeito de cátions, detergentes, inibidores e aditivos na atividade da exo-poligalacturonase.....	57
<b>Tabela 5.3.</b> Resultados de atividade enzimática e de umidade em cada módulo do reator após 24 horas de fermentação.....	68
<b>Tabela 5.4.</b> Análise de variância da produção de pectinase no reator.....	70
<b>Tabela 5.5.</b> Teste de Tukey para comparação de médias de atividade enzimática por módulo do reator.....	71
<b>Tabela 5.6.</b> Produção da enzima em ensaios com vazão de 120L/h e UR de 95 %.....	72
<b>Tabela 5.7.</b> Temperaturas máximas registradas durante as diferentes fermentações ao longo de 24 horas.....	75
<b>Tabela 5.8.</b> Umidade nos módulos do reator, para vazão de 180L/h e 95% UR (Umidade inicial do meio poroso 70%).....	76
<b>Tabela 5.9</b> Comparação da produção de exopoligalacturorase em FES em frasco e reator de bancada.....	88

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**a<sub>a</sub>**: atividade de água

**LiP**: lignina peroxidase

**MnP**: Manganês Peroxidase

**rpm**: revoluções por minuto

**U**: unidade

**mL**: mililitro

**μM**: milimolar

**μL**: micro litros

**μmol**: micro molar

**M**: molar

**U/mL**: Unidades por mililitro

**U/g**: Unidades por grama

**T**: termopar

**Tar**: temperatura do ar

**Tc**: temperatura da camisa

**G**: vazão de ar

**UR**: umidade relativa

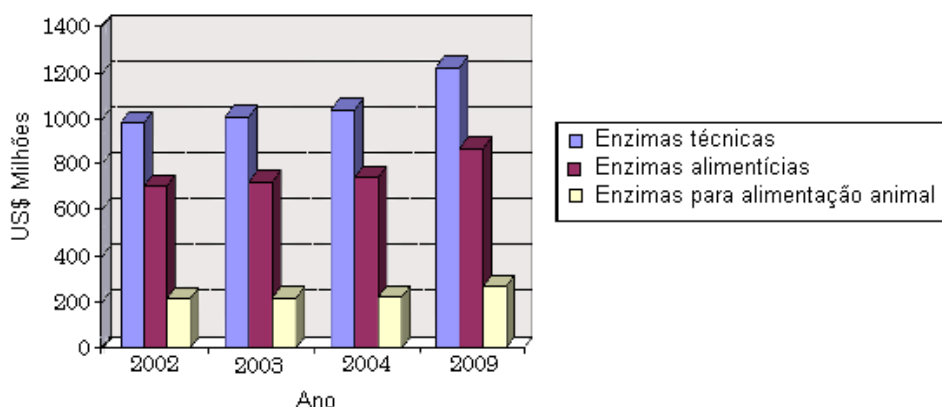
**L/h**: litros por hora

**DIC**: Delineamento inteiramente casualizado

## 1. INTRODUÇÃO.

O emprego de enzimas na indústria alimentícia está disseminado no processamento de produtos variados, tais como xaropes de amido, pães, leite deslactosado, cervejas, vinhos, sucos de frutas e carnes, dentre muitos outros. A atividade enzimática está relacionada ao melhoramento das qualidades sensoriais do produto, como cor, sabor e textura, e elevação de seu valor nutricional. A Figura 1.1 mostra o consumo anual de enzimas no mundo em processos industriais, mercado que em 2007 movimentou cerca de 2,3 bilhões de dólares, e a perspectiva de consumo de enzimas (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008). As maiores aplicações de enzimas são na medicina, indústria têxtil, indústrias de alimentos e bebidas e, mais recentemente, em procedimentos analíticos. Detergentes (17%), alimentos e rações (17%), couro e papel (17%), têxtil (8%), farmacêutica (41%) são as indústrias que mais usam enzimas produzidas industrialmente (CHANDEL *et al.*, 2007). Diante de tais perspectivas, avanços nas tecnologias de obtenção de enzimas são desejáveis.

As enzimas mais empregadas na industrialização de alimentos são pectinases, proteases (papaína, bromelina, renina e pepsina), amilases e glico-isomerases, embora outras como pululanase, celulase, hemicelulase, xilanase, lipase, invertase, lactase e glicose oxidase sejam freqüentemente encontradas. A preferência pelo uso industrial de enzimas decorre de sua natureza protéica, seu uso em baixas concentrações e sua inocuidade, uma vez que estas enzimas são normalmente inativadas durante o processamento (BON, 1997).



**Figura 1.1** Produção anual de enzimas aplicadas em processos industriais (Fonte: Business Communications Co., 2005).

As pectinases são principalmente produzidas por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos de origem microbiana varia de acordo com o organismo produtor, dessa forma, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para a utilização industrial das mesmas. Estas enzimas constituem um grupo que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal, através de reações de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (pectinesterases) (FOGARTY, WARD, 1972).

Os aspectos básicos de produção de pectinases em fermentação em estado sólido (FES) têm sido estudados por vários autores, comprovando que a produção de enzimas por FES é sempre superior à obtida por fermentação submersa (FSm). Essa diferença de produtividade entre FES e FSm é reflexo dos diferentes mecanismos regulatórios (repressão catabólica das enzimas), temperatura e pH ótimo, termoestabilidade e afinidade pelo substrato utilizado (ALAZARD, RAIMBAULT, 1981). A grande maioria das pesquisas realizadas para a produção de pectinases microbiana envolve a utilização de microrganismos mesofílicos, embora pesquisas de produção de enzimas por microrganismos termofílicos tenham crescido significativamente nos últimos anos (HOLST *et al.*, 1997; VIEILLE, ZEIKUS, 2001; MARTINS *et al.*, 2002; BADHAN *et al.*, 2007).

Microrganismos termofílicos geralmente são definidos como aqueles que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 50 e 80 °C e produzem enzimas com atividade máxima em temperaturas elevadas, entre 60 e 80 °C. Algumas propriedades apresentadas por essas enzimas são responsáveis pela atuação e estabilidade das mesmas em altas temperaturas, as quais incluem: interações eletrostáticas e hidrofóbicas, que aumentam sua rigidez; número de ligações de hidrogênio; presença de ligações dissulfeto; união das subunidades protéicas; composição de aminoácidos e presença de sais inorgânicos, dentre outros (VIEILLE, ZEIKUS, 2001; BRUINS, JANSSEN, BOOM, 2001). Como exemplos de enzimas termorresistentes, podem-se citar a xilanase (MILAGRES *et al.*, 2004; BADHAN *et al.*, 2007), celulasas (KALOGERIS *et al.*, 2003; BADHAN *et al.*, 2007), endoglucanases (PARRY *et al.*, 2002), pectina liase e poligalacturonase (MARTINS *et al.*, 2002), protease (MERHEB *et al.*, 2007),  $\beta$ -glicosidase (LEITE *et al.*, 2008) e  $\alpha$ -glicosidase (CARVALHO *et al.*, 2007) todas produzidas pelo fungo termofílico *Thermoascus auranticus*.

A FES reproduz o processo natural que os microrganismos desenvolvem na compostagem e silagem (PANDEY, 2002). Este processo tem sido utilizado por centenas de anos na cultura oriental para a preparação de alimentos como shoyu e misô, queijos, e de iogurtes e pães em países ocidentais (VINIEGRA- GONZALEZ, 1997).

De modo geral, a FES pode ser definida como um processo no qual uma matriz sólida porosa (substrato - fonte de carbono e energia) é colocada em contato com uma cultura de microrganismos, com presença de água suficiente para garantir o crescimento e as atividades metabólicas das células, sem que, no entanto, a capacidade de retenção de água pela matriz porosa seja excedida (PANDEY, 2002; WANG, YANG, 2007, SINGHANIA *et al.*, 2009). A FES pode ser feita diretamente com biomateriais de baixo custo (amido, celulose, lignina, hemicelulose, quitina, resíduos agro-industriais, etc.) com ou sem pré-tratamento (WANG, YANG, 2007; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Ensaio de bancada, demonstram claramente a viabilidade da FES na produção de enzimas, sendo o emprego de microrganismos termofílicos uma opção a ser considerada, devido à menor incidência de contaminação do biorreator, em virtude das temperaturas mais elevadas requeridas por estes organismos impedirem o crescimento de mesofílicos contaminantes, que são a maioria dos microrganismos do ambiente (HOUGH, DANSON, 1999). Ademais, tem sido comprovada na literatura a relação consistente entre a termofilia destes microrganismos e a termoestabilidade de enzimas intra e extracelulares (ANDRADE, PEREIRA JR, ANTRHANIQUIAN 1999; MILAGRES *et al.*, 2004), reforçando o interesse no estudo desses organismos para a FES. Dentre os microrganismos termofílicos, os fungos filamentosos são dos mais indicados, por serem mais versáteis que as bactérias, serem de fácil manejo, não patogênicos e, a maioria, de fácil esporulação (GUTIERREZ-ROJAS, FAVELA -TORRES, 1992).

Para a ampliação de escala do biorreator, muitos aspectos da engenharia do sistema devem ser verificados em escala de laboratório para, posteriormente, com parâmetros da dinâmica da fermentação bem esclarecidos, fazer testes de aumento de escala. Os principais aspectos a serem avaliados são: transferência de massa ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), efeitos da espessura e compactação do substrato, taxa de aeração, temperatura, umidade, dissipação do calor e o desenho do reator (DURAND 2003; RAGHAVARAO, RANGANATHAN, KARANTH, 2003).

O desenvolvimento deste processo fermentativo apresenta dificuldades técnicas denominadas de "sistema quadrático": transporte de sólidos, biomassa, água e ar (LONSANE *et al.*, 1992). O controle do ambiente interno do biorreator é difícil de ser mantido, particularmente no que se refere à umidade e temperatura (PANDEY, SELVAKUMAR, SOCCOL, 1999). As dificuldades relativas à temperatura são decorrentes da atividade microbiana, e às de umidade, resultantes da interação entre a matriz porosa e o ar percolante. Assim, a transposição dos resultados de uma escala para outra não é trivial, resultando em baixa produtividade do reator.

Muitas variáveis podem interferir no processo fermentativo, tais como a vazão, a temperatura e a umidade relativa do ar, a temperatura da parede do tubo e as características do meio poroso.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Enzimas de origem microbiana

Há muito tempo, o homem utiliza enzimas para catalisar reações em diversos bioprocessos. A produção de vinho, pão e queijo antedata os tempos bíblicos, embora não se conhecesse o mecanismo das reações envolvidas (HARGER, SPRADA, HIRATSUKA, 1982).

De acordo com Leadlay (1993), as enzimas já eram utilizadas diariamente na indústria para acompanhar reações químicas fora da célula muito antes de se entender a sua natureza e função. Com o gradual desenvolvimento do conhecimento da natureza das enzimas, extratos enzimáticos obtidos a partir de certos tecidos animais, como o pâncreas e a mucosa do estômago ou a partir de tecidos vegetais, como o malte, abacaxi e mamão ou produzidas por bactérias, leveduras e fungos, passaram a ter muitas aplicações.

Os microrganismos são dotados de imenso potencial de degradação de material orgânico produzindo enzimas, o qual têm sido explorados comercialmente ao longo dos anos (JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005), tendo sido desenvolvidos processos para a produção em escala comercial. Várias revisões bibliográficas foram publicadas ressaltando a produção de enzimas em FES utilizando biomateriais como substrato (PANDEY *et al.*, 2001; ARORA, BRIDGE, BHATNAGAR, 2004). Fungos filamentosos são largamente utilizados em FES e continuam sendo a principal fonte de produção de antibióticos e enzimas. Como saprófitos, os fungos filamentosos secretam grande quantidade de enzimas e outros produtos do metabolismo (ARCHER *et al.*, 1994).

A produção comercial de uma enzima envolve as etapas de produção, separação, recuperação e purificação. De acordo com Rodrigues (1993), os equipamentos para os processos de separação e purificação podem representar até 90% do custo final de um produto obtido por fermentação. Em relação à produção industrial de enzimas microbianas, os seguintes requisitos devem ser observados (FELLOWS, 1994): os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade.

As enzimas microbianas são obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos como também podem ser obtidas por cultivos submersos (FSm) com o emprego de substratos

líquidos. O substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação celular. Além disso, podem prover também nutrientes específicos para o crescimento e determinados minerais para a produção de enzima. A produção de enzimas pelo cultivo submerso exige a preparação prévia de inóculo, que é preparado nas mesmas condições de incubação que o cultivo final para a produção da enzima. Alguns exemplos de substratos de baixo custo e disponíveis em abundância para a FSm são os melaços, hidrolisados de amido e água de maceração de milho (FELLOWS, 1994). Os substratos mais comuns para a FES são farelo de trigo, milho, casca de frutas, grãos de cereais, madeira e palha (FELLOWS, 1994; WARD, 1989).

Após a fermentação, as enzimas extracelulares são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento da parede celular, sendo neste caso a recuperação da enzima mais difícil e seu rendimento inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular. Quando é necessária a extração do restante da enzima intracelular, pode-se proceder à precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração.

A quantificação de determinada enzima presente em um meio é complexa, pois parte da enzima pode estar inativa, ou parcialmente ativa, além da possibilidade da existência de outras enzimas no mesmo meio. O parâmetro mais importante que deve ser considerado na quantificação de uma enzima é a sua atividade, (CHAPLIN, BUCKE, 1992). Essa atividade geralmente é medida como unidade enzimática (U), parâmetro internacional que é definido como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 $\mu$ mol de substrato por minuto, em condições definidas de teste. Temperatura, pH, concentração enzimática são variáveis a serem controladas em testes de atividade enzimática (HENRY, 1964; CHAPLIN, BUCKE, 1992; SEGEL, 1976).

Surmely e colaboradores (2003) apresentam o *katal* (*kat*) como a unidade internacional de atividade enzimática. O *katal* é definido como a quantidade de enzima que transforma um Mol de substrato por segundo, sob condições experimentais padrões. Para uma unidade menor usa-se a quantidade de enzima que transforma 1 $\mu$ mol de substrato por minuto. Apesar dessa normatização, cada fabricante de enzima define as próprias unidades em condições experimentais particulares.



## 2.2. Fermentação no Estado Sólido (FES)

A FES possui várias definições conforme propõem os seguintes autores. Hesseltine (1977) descreveu como uma fermentação na qual o substrato não é líquido, Moo-Young, Moreira, Tengerdy (1983) a designaram como processo onde os microrganismos utilizam materiais insolúveis para seu crescimento e metabolismo. Segundo Aidoo, Hendry, Wood (1982) a FES engloba toda fermentação que ocorre sob substrato sólido, bem como em suporte sólido nutricionalmente inerte. Raimbault e Alazard (1980), Maheva e colaboradores (1984), Lonsane e colaboradores (1985), Tengerdy (1985), Mudgett (1986) e Oriol (1987) definiram como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido entre as partículas. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida sobre um suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (SOCCOL, 1992).

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos, uma vez que tais meios sólidos se assemelham aos meios naturais, principalmente o solo, local de desenvolvimento desses fungos. Suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas que são propícias à colonização de matrizes sólidas porosas (ORIOLO, 1987), que pode ser constituída de substrato úmido ou de suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em solução. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em umidades muito baixas, até 12%. Porém, os níveis de atividade de água podem variar de 12 a aproximadamente 80%. A atividade de água depende do nível máximo de retenção de água do material utilizado como substrato ou suporte (LONSANE *et al.*, 1985). Fungos também suportam pressões osmóticas elevadas (BEUCHAT, 1983), diferentes de leveduras e bactérias.

De acordo com Soccol (1992), a fermentação em meio sólido é constituída por um sistema trifásico (sólido – líquido - gasoso), no qual a fase sólida está inteiramente ligada à fase líquida. De forma superficial, pode-se dizer que a água encontra-se em três diferentes formas e em proporções variáveis no meio de cultura:

- a) Água ligada ao sólido (água de constituição);
- b) Água fracamente ligada ao sólido (água de solvatação);
- c) Água adsorvida por capilaridade ao sólido (água livre).

Soccol (1992) descreve que a fase sólida é constituída pelo suporte de crescimento e pelo reservatório de água, na qual estão dissolvidos os nutrientes e a fonte de energia

responsável pelo crescimento do microrganismo. A essa fase podem ser adicionados sais, vitaminas ou outras fontes de carbono em função das exigências do microrganismo ou produto de metabolismo desejado. A fonte de carbono é constituída, na maioria dos casos, por polímeros vegetais de alto peso molecular. A degradação dessas macromoléculas necessita da síntese de enzimas que permitam sua assimilação pelo microrganismo. Segundo Hesseltine (1977), as fermentações em meio sólido são classificadas em três diferentes categorias em função da tecnologia empregada: fermentação estática; com agitação ocasional ou com agitação contínua.

Em função da natureza do suporte, também pode se distinguir dois tipos de fermentação no estado sólido (FES), segundo (SAUCEDO-CASTAÑEDA, *et al.*, 1992):

*A- Cultura sólida em fase substrato-suporte:* Neste caso a fase sólida é constituída por material que possui função de suporte e fonte de nutrientes.

Vários autores trabalharam utilizando essa metodologia, tais como: Hesseltine (1972); Raimbault e Alazard (1980); Moo-Young, Moreira, Tengerdy (1983); Tengerdy (1985); Soccol (1992). Para exemplificar, na Tabela 2.1 são citados alguns exemplos de produtos produzidos em FES.

**Tabela 2. 1** Exemplos de produtos produzidos utilizando diferentes substratos em FES.

<b>Autor</b>	<b>Enzima/produto</b>	<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo</b>
Costa (1996)	amiloglucosidase	Farelo de arroz	<i>A. niger</i>
Vandenberghé (2000)	Ácido cítrico	Farelo de mandioca	<i>A. niger</i>
Brand <i>et al.</i> , (2002)	Detoxificação biológica	Casca de café	<i>A. niger</i>
Tunga; Tunga (2003)	Amilase	Farelos de trigo, arroz, milho, bagaço de cana	<i>A. oryzae</i>
Azevedo (2004)	Isoflavonas	Farelo de soja	<i>A. Sojae</i>
Freitas <i>et al.</i> , (2006)	Pectinases	Bagaço de laranja e farelo de trigo	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>e Monascus sp.</i>
Merheb <i>et al.</i> , (2007)	Protease	Farelo de trigo e caseína	<i>Thermoascus aurantiacus</i>
Leite <i>et al.</i> , (2008)	$\beta$ -glucosidases	Farelo de trigo	<i>Thermoascus aurantiacus</i> e <i>Aureobasidium pullulans</i>

B- *Cultura sólida em uma fase suporte impregnada de meio líquido*: Neste tipo de fermentação, a fase sólida é considerada como suporte inerte, que não constitui fonte de nutrientes para os microrganismos, mas serve de reservatório para solução nutritiva que estará absorvida na matriz sólida. Os materiais utilizados são diversos, a maioria possui alta capacidade de retenção de água, como é o caso de fibras de celulose, poliuretano, cinzas vulcânicas, esponjas, cascas de árvore, vermiculite, amberlite (resinas trocadora iônica) (SOCCOL, 1992).

Esse processo de fermentação é menos utilizado podendo-se citar os trabalhos citados por Soccol (1992) expostos na Tabela 2.2:

**Tabela 2. 2** Exemplos de produtos produzidos utilizando diferentes suportes inertes em FES.

<b>Autor</b>	<b>Enzima/produto</b>	<b>Suporte inerte</b>	<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo</b>
Lakshminarayana et al., (1975)	Ácido cítrico	Bagaço de cana-de-açúcar	Sacarose ou melaço de cana	<i>Aspergillus niger</i>
Yasuhara et al., (1994)	Proteases	Membrana	Meio de cultura	<i>Aspergillus oryzae</i>
Larroche, Desfarges, Gros (1986)	Esporos	Cinzas de vulcão	-	<i>Penicillium roqueforti</i>
Auria, Palacios, Revah (1992)	Biomassa	Vermiculite e amberlite	Sacarose e sais	<i>Aspergillus niger</i>
Zilioli et al., (2004)	Goma xantana	Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrolisado de bagaço de mandioca	<i>Xanthomonas campestris</i>

A fermentação em estado sólido é amplamente utilizada para a obtenção dos seguintes produtos, conforme descrito por Soccol (1992):

- a) Alimentos orientais fermentados: tempeh, misô, shoyu, koji;
- b) Enriquecimento protéico de produtos e resíduos agrícolas: uso de fungos para melhorar a digestibilidade, o gosto, a cor, o aroma e a textura. Na produção de proteínas, os fungos filamentosos apresentam vantagens quando comparados à utilização de bactérias e leveduras, pois os fungos possuem perfil protéico mais adequado, com maior concentração de aminoácidos essenciais;

- c) Fungos entomopatogênicos para controle de pragas agrícolas.
- d) Queijos do tipo Roquefort, Camembert;
- e) Produção de enzimas: pectinases, ligninases, proteases, xilanases, fitases, celulases, amilases, dentre outras;
- f) Fungos comestíveis como champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) e *shii-take*;
- g) Outros produtos: ácido cítrico, ácido L(+) láctico, etanol, giberelinas, antibióticos, toxinas, alcalóides e aromas.

### 2.3. Vantagens e desvantagens da FES

O uso da FES ou da FSm deve ser estudado de acordo com o microrganismo a ser utilizado e o produto que se deseja obter. Rodríguez-Couto e Sanromán (2006) confirmaram que a FES é o melhor sistema para a produção de enzimas e que o rendimento da produção é maior do que na Fsm, como pode ser visto na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3.** Comparação da produção de diferentes enzimas a través da FES e FSm.

Microrganismo	Produção FES vs FSm	Referência
<i>A. niger</i>	11 x	Solis-Pereira <i>et al.</i> , (1993)
<i>A. niger</i>	6 x	Maldonado, Strasser de Saad (1998)
<i>A. niger</i>	10 x	Diaz_Godinez <i>et al.</i> , (2001)
<i>Bacillus sp</i>	60* x	Solis-Pereira <i>et al.</i> , (1993)
<i>Paecilomyces clavisporus</i>	28* x	Souza <i>et al.</i> , (2003)
<i>Fusarium moniliforme</i>	3*x	Niture; Pant (2004)
<i>A. sojae</i> ATCC 20235	48%	Ustok <i>et al.</i> , (2007)
<i>A. niger</i> DMF27 e DMF 45	33%*	Patil, Dayanand (2006a)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	20x	Alania <i>et al.</i> , (2009)

\* comparação de U/g (FES) com U/mL (FSm)

A fermentação em estado sólido apresenta as seguintes vantagens: simplicidade de meio de cultura; redução dos efluentes líquidos a tratar; redução das contaminações resultantes

da baixa umidade do meio fermentativo; condições de cultura próximas às dos meios naturais dos microrganismos; para as fermentações tradicionais, a microflora do suporte serve como inóculo; fácil aeração devido à porosidade do material; utilização direta dos sólidos fermentados; extração facilitada pela alta concentração de produtos; volume do fermentador menor do que o da cultura líquida e baixa demanda de energia. Segundo Viniegra-González e colaboradores (1997) a alta produção de biomassa, alta produção de enzima e baixa hidrólise de proteína contribui para a alta produtividade da FES em comparação com a FSm.

As principais deficiências relacionadas à FES são a dissipação deficiente de calor, devido à baixa condutividade térmica dos materiais sólidos; segregação de umidade e conseqüente distribuição heterogênea de microrganismos e de produtos; necessidade de pré-processamento do substrato e pós-processamento do material sólido para remoção do produto.

As desvantagens associadas à FES em relação à FSm são: risco de elevação excessiva de temperatura; difícil regulação dos parâmetros de cultura (por exemplo: pH e umidade); pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático); alta taxa de inoculação, quando não se utiliza a microflora natural; estimação precisa de biomassa; papel essencial da umidade e da atividade de água.

## **2.4. Matérias-primas empregadas na FES**

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso da FES, os substratos sólidos são constituídos, basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. O material sólido é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa, que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade, enquanto que os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados - 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SOCCOL, 1992).

Os resíduos de origem agroindustrial são os substratos mais utilizados neste processo, tais como: palha de arroz (BADHAN *et al.*, 2007), resíduos de flor de girassol (PATIL,

DAYANAND, 2006a), bagaço de laranja (MARTINS *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2005, MARTIN, 2006), resíduo de uva (BOTELLA, 2007), polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (GUTIERREZ-ROJAS, TORRES, 1992; COSTA, 1996). A FES apresenta-se como alternativa viável de agregação de valor a estes resíduos para a produção de enzimas microbianas (PANDEY *et al.*, 2000; HESSELTINE, 1972; GUTIERREZ-ROJAS, TORRES, 1992).

Para a obtenção de pectinases em FES, pode ser utilizado como substrato o bagaço de laranja, resíduo sólido da indústria de sucos cítricos que corresponde a cerca de 42% do total da fruta e é composto principalmente por fibras. Porém, esse bagaço forma aglomerados indesejáveis, dificultando a aeração e remoção de calor metabólico, sendo conveniente empregar um suporte inerte a este processo, como o bagaço de cana, por exemplo, para aumentar a permeabilidade do meio poroso. Esse resíduo é normalmente empregado para a produção de ração animal, de modo que seu emprego como fonte para obtenção de pectinase aumenta seu valor agregado. Alguns trabalhos (FREITAS *et al.*, 2006; PHUTELA, 2005; MARTINS *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2002; ISMAIL, 1996), já empregaram bagaço de laranja em FES para a produção de pectinase.

O farelo de trigo, resultante do processamento da farinha, é rico em nitrogênio, carbono e sais inorgânicos e é empregado como fonte de energia facilmente disponível para o metabolismo microbiano, de modo a acelerar processo fermentativo em seus estágios iniciais. Por sua composição e alta disponibilidade, é considerado um substrato ideal, sendo amplamente estudado para utilização em FES (EL-HAWARY, MOSTAFA, 2001).

O uso destes materiais agroindustriais deve-se ao fato de apresentarem as seguintes características: são recursos renováveis; sua produção depende de outra atividade produtiva, para as quais, muitas vezes é um subproduto ou produto secundário; são produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento adicional (GUTIERREZ-ROJAS, TORRES, 1992).

## 2.5 Importância da água no metabolismo fúngico durante a FES

A água é essencial para qualquer mecanismo biológico e conseqüentemente exerce papel importante na fermentação, seja ela sólida ou submersa (GERVAIS, MOLIN, 2003). Dentre essas funções na fermentação pode-se citar:

Função solvente: veículo de transporte e de eliminação de nutrientes e de metabólitos, na forma dissolvida,

Função estrutural: estabilidade e funcionalidade das estruturas biológicas em forma molecular e celular,

Estabilidade molecular: estabilidade da estrutura de biopolímeros, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos (SCHWAN, 1965; KUNTZ, 1971),

Estabilidade celular: estabilidade da estrutura lamelar da membrana plasmática (preservação da permeabilidade). Também ajuda na manutenção do volume celular, devido ao fato da água se ligar a moléculas como polióis, açúcares ou enzimas (CROWE, CROWE, DEAMER, 1982; QUINN, 1985).

Quando um sólido é exposto a um ambiente com ar não saturado, à temperatura constante, a pressão de vapor no interior do sólido tende a se igualar à pressão parcial do vapor no ar. Estabelecendo-se o equilíbrio de concentrações de água presente no sólido e no gás, o sólido atinge um conteúdo de umidade denominado *teor de umidade de equilíbrio*. Nessa condição, a pressão de vapor do meio denomina-se pressão de vapor de equilíbrio, sendo a razão entre esta e a pressão de vapor de saturação conhecida como umidade relativa de equilíbrio ou atividade de água ( $a_a$ ) (GUGGENHEIN, 1967). Em reações microbianas, a redução de  $a_a$  prolonga a fase lag, reduz a taxa específica de crescimento e resulta em baixa quantidade de biomassa produzida (ORIOU *et al.*, 1988). De um modo geral, bactérias crescem em  $a_a$  superior a 0,9, enquanto os fungos deixam de crescer somente em  $a_a$  inferior a 0,6. Há casos em que o mínimo requerido para alguns fungos é cerca de 0,9, apresentando crescimento ótimo em  $a_a$  acima de 0,96 (RAIMBAULT, 1998).

A  $a_a$  pode afetar diretamente a ação enzimática devido ao processo de osmoregulação da célula descrito por Nishio, Tai e Nagai, (1979). A esporulação do fungo também é afetada pela  $a_a$ . A influência da baixa atividade de água na FES não é bem entendida; em baixa  $a_a$  a disponibilidade de nutrientes é baixa, afetando o metabolismo do fungo (CHARLAN; HOROWITZ, 1974). A inibição de enzimas e a variação da permeabilidade da membrana celular estão relacionados com a  $a_a$ . O controle da  $a_a$  é de grande interesse para otimizar a produção

de metabólitos como aromas, antibióticos e enzimas. A produção de metabólitos secundários também dependem da  $a_a$ . Foi determinado que existe relação entre quantidade de enzima produzida e  $a_a$  (GRAJEK; GREVAIS, 1987). Estes autores observaram a influência da  $a_a$  na biosíntese de poligalacturonase, D-xilanase e  $\beta$ -glicosidase em cultivos sólidos por *T. viride* e verificaram que a produção de enzima foi fortemente afetada pela  $a_a$  do substrato. Na tabela 2.4 são mostrados exemplos de metabólitos produzidos em diferentes  $a_a$  ou umidade relativa.

**Tabela 2.4.** Exemplo de metabólitos produzidos em diferentes  $a_a$  ou umidade relativa.

<b>Autor</b>	<b>Produto</b>	<b>Microrganismo</b>	<b><math>a_a</math></b>	<b>Umidade (%)</b>
Northolt, Van Egmont, Paulsch (1984)	Ocratoxina 'A'	<i>Penicillun viridicatum</i>	0,87	
Ridder, Nokes, Knutson (1999)	Xilanase	<i>Tricoderma longibrachiatum</i>		55
Ridder, Nokes, Knutson (1999)	Xilanase	<i>Aspergillus tereus</i>		75
Liu, Tzeng (1999)	Ciclodepsipeptideos	<i>M. anisopliae</i>	0,921	71
Benjamin, Pandey (1998)	Lipase	<i>Cândida rugosa</i>	0,92	
Tallu (1986)	Aroma	<i>T. viride TS</i>	0,96	

A  $a_a$  além do efeito de disponibilidade para o metabolismo microbiano, o conteúdo de água de um substrato está relacionado às suas características físicas e estruturais, a difusão de nutrientes e metabólitos (GERVAIS, BENSOUSSAN, 1994).

Se a quantidade de água é insuficiente e não permite a boa difusão de soluto e gás, o metabolismo da célula diminui ou pode parar devido à falta de substratos ou pela presença de alta concentração de metabólitos inibidores na célula ou perto dela. Ademais, se a quantidade de água intra ou extracelular é insuficiente para manter algumas propriedades funcionais de algumas enzimas (TODD, 1972), sua inatividade cria o desequilíbrio na cadeia metabólica da célula podendo acontecer a desnaturação da membrana plasmática, e assim, todas as propriedades de transporte através desta são afetadas (DE LOECKER, PENNINGK, KEREMANS, 1978; WOLFE, STEPONKUS, 1983).



Em decorrência das características do processo fermentativo, o conteúdo de água dos substratos para FES é limitado a pequenas quantidades. De acordo com Lonsane e colaboradores (1992), o teor de umidade ideal deve ser estabelecido, uma vez que valores acima ou abaixo do ótimo podem afetar, significativamente, a produtividade do processo. Pandey (1992) cita a importância do conteúdo adequado de umidade para cada processo, uma vez que a alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato, dificultando a penetração de oxigênio e facilitando a contaminação por bactérias. Por outro lado, baixos níveis de umidade levam a crescimento pobre e pequena acessibilidade aos nutrientes. Com relação ao crescimento de fungos filamentosos, o autor cita que altos valores de umidade do meio favorecem a germinação de esporos ou o crescimento micelial, enquanto valores baixos de  $a_a$  estimulam a esporulação.

È reconhecido que o crescimento e metabolismo dos microrganismos ocorrem na fase líquida. A difusão do soluto como a transferência de gás dissolvido ocorre na fase líquida ao redor do microrganismo. A difusão do soluto no substrato deve ocorrer na fase líquida, assim como, a difusão de gás no substrato pode ocorrer tanto na fase líquida como na gasosa. Assim, a substituição da fase aquosa pela fase gasosa aumenta a transferência de oxigênio, mas evita a difusão da maioria dos substratos (GERVAIS, BENSOUSSAN, 1994).

Um fator importante que deve ser levado em conta é a necessidade de otimizar a  $a_a$  do leite fermentativo, que é essencial para o crescimento microbiano, levando em conta a evolução da absorção da água pelo substrato sólido durante a fermentação. Devido à produção de enzimas como celulase (hidrólise do substrato) poderia ocorrer decréscimo na  $a_a$ , assim como a perda de água, por isso, o ajuste da umidade relativa do ar introduzido no reator é muito importante.

Sato e colaboradores (1982) citado por Soccol (1992) trabalhando com o crescimento de *Aspergillus oryzae* para a produção de amilases, conseguiram aumentar em duas vezes o consumo de oxigênio e, em três vezes a produção de esporos e enzimas pela adição de partículas de polpa de madeira úmida. As partículas de madeira, atuando como inerte, tiveram dupla finalidade: por um lado suprir a umidade ao meio que desidratava e, por outro, reduzir a densidade do meio, resultando em melhor aeração.

Normalmente, em processos de FES, considera-se como parâmetro de controle o teor de umidade do meio, raramente levando-se em conta a  $a_a$  ótima para as reações. Em alguns trabalhos encontrados na literatura, como o de Dorta e Arcas (1998), há uma tentativa de manutenção da umidade do leite através de aeração saturada. Porém, costuma ocorrer segregação de umidade, com secagem na parte inferior do leite, evidenciando a falta do

controle da umidade relativa do ar de entrada, uma vez que se o mesmo estivesse realmente saturado, a secagem não ocorreria. Ademais, muitos dos processos fermentativos poderiam ser favorecidos pelo controle de atividade de água ideal e pelo conhecimento das características higroscópicas do substrato utilizado, além do conteúdo de umidade requerido pelo microorganismo estudado (GERVAIS, MOLIN, 2003).

## 2.6. Reatores utilizados em FES

Muitos autores têm reportado a produção de enzimas em FES em escala de laboratório, porém, quando estes processos são reproduzidos em escala maior, os resultados são diferentes. Isto pode ser devido à grande mudança nas condições de crescimento do microorganismo na nova escala de fermentação. Em escala de frascos, as condições do processo fermentativo, tais como, temperatura, atividade de água e pH podem ser facilmente mantidas homogêneas e constantes durante o processo fermentativo. Em contraste, a heterogeneidade do meio fermentativo em escala de biorreator é inevitável. Isto devido à baixa taxa de transferência de calor e massa do meio fermentativo (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, PÉREZ-CORREA, 2007). A remoção do calor metabólico gerado durante a fermentação é um dos maiores desafios no projeto de biorreatores, especialmente em processos que utilizam fungos, uma vez que qualquer agitação com o objetivo de remover o calor pode danificar a estrutura fisiológica do fungo (MITCHELL *et al.*, 2000). Assim, as características morfológicas do fungo, especialmente a presença de septo na hifa, bem como sua resistência à agitação mecânica, devem ser considerados no projeto de biorreatores (DURAND, 2003).

Com relação à transferência de massa, particularmente de água, elevada percentagem de umidade resulta em baixa permeabilidade do meio, conseqüentemente, impede a boa penetração do oxigênio, enquanto que baixa umidade dificulta o acesso aos nutrientes, efeito que ocasiona pouco crescimento microbiano (PANDEY, 2003). Em micro-escala de FES a transferência de massa depende do crescimento de microorganismo, o qual depende da difusão inter e intra partícula de  $O_2$  e  $CO_2$ , da produção de enzima, da absorção de nutrientes e da formação de metabólicos, já a transferência de massa dentro de um reator inclui a vazão de ar, tipo de substrato, agitação do substrato, desenho do biorreator, espaço inter partículas, tamanho de partículas e do microorganismo no sistema fermentativo (KAR, BANERJEE, BHATTACHARYYA, 1999).

Vários tipos de reatores têm sido utilizados em FES nas últimas décadas. Estes podem ser divididos em cinco categorias, baseados na agitação e aeração. Com relação à agitação, três estratégias são possíveis: o meio fermentativo permanece estático, ou agitado não muito frequentemente; agitação razoável e períodos estáticos; meio poroso agitado continuamente. Com respeito à aeração, duas estratégias são possíveis: o ar pode ser circulado na superfície do leito fermentativo ou forçadamente através dele (HARDIN, MITCHELL, 1998).

Entre os biorreatores comumente empregados em FES incluem-se os reatores de leito-fixo, os tambores rotativos e os de leito fluidizado gás-sólido. Para a escolha do modelo ideal a ser utilizado, deve-se considerar: objetivos da fermentação, custos envolvidos no processo, facilidade de carga, descarga, limpeza e manutenção do equipamento, possibilidade de monitoramento e controle dos parâmetros do processo, características do microorganismo empregado e necessidade ou não de sistema estéril. É importante que o reator seja construído com material inócuo, resistente à corrosão e não tóxico para os organismos. Além disso, deve promover aeração eficiente e manter a uniformidade e integridade do substrato (RAGHAVARAO, RANGANATHAN, KARANTH, 2003).

Temperatura é um dos mais importantes parâmetros referente ao funcionamento de biorreatores. O controle da temperatura está diretamente relacionado ao equilíbrio higroscópico e a necessidade de aeração. Como há grande quantidade de calor gerado durante a FES, o qual é diretamente proporcional à atividade metabólica do microrganismo, às vezes, o acúmulo de calor é grande, desnaturando os produtos formados e acumulados no meio (PANDEY, 2003; HAMIDI-ESFAHANI, SHOJAOSADATI, RINZEMA, 2004).

Várias técnicas foram testadas para a retirada ou redução do calor gerado durante a fermentação, entre elas, resfriamento da parede do tubo, variações na vazão de ar, entre outras. Ashley, Mitchell, Howes, (1999) propuseram a reversão do fluxo (entrada superior ou inferior, intermitentemente) de ar no reator a cada 5 minutos com o intuito de amenizar o aquecimento do leito de fermentação. Verificaram que ocorreu flutuação significativa da temperatura somente no quarto inferior e superior do leito de fermentação. A conclusão do estudo foi que a reversão do fluxo de entrada de ar no reator não interferem no resfriamento do leito fermentativo do reator.

Asngsurasak e Mitchell (1995) utilizaram modelos matemáticos de transferência de calor em reatores para investigar o efeito da altura do leito e a temperatura e a vazão do ar no desempenho do mesmo. Constataram que os modelos só resultaram parcialmente eficientes, uma vez que foi reduzido o gradiente axial de temperatura, mas não desde o começo de operação do reator.

Sangsurasak e Mitchell (1998) propõem um modelo que sugere que a evaporação pode remover até 78% do calor gerado durante os picos de geração de calor, ou seja, o ar entra saturado, mas devido à geração de calor, a temperatura aumenta e o ar fica abaixo da saturação, o que permite que ele evapore água, reduzindo a temperatura do leito.

### **2.6.1. Reatores de leito móvel**

O reator de tambor rotativo tem recebido atenção nos últimos anos, pois apresenta bom potencial de transferência de calor, mesmo com agitação relativamente baixa. O bom desempenho dos reatores desta classe, quanto às homogeneidades térmica, de umidade, de concentração de biomassa e de bioprodutos foi evidenciado em vários trabalhos publicados (KALOGERIS *et al.*, 1999, 2003; DOMINGUEZ *et al.*, 2001).

Nos reatores de leito móvel, como o fluidizado gás-sólido e o tambor rotativo, o contato entre as fases sólida e fluida é intenso, conferindo grande homogeneidade térmica a estes sistemas. Estes reatores podem ser operados continuamente ou de modo intermitente. Neste último caso, durante o tempo em que o reator permanece estável, opera como reator de bandejas (MITCHELL *et al.*, 2000). O efeito da agitação depende do microrganismo e do meio fermentativo. Biorreatores estáticos são utilizados ao invés de reatores com agitação, pois a agitação causa danos no micélio do fungo e pode acarretar na diminuição da taxa de esporulação e no número final de esporos (van de LAGEMAAT, PYLE, 2001).

Não obstante, é importante considerar que muitos fenômenos observados em escala de bancada podem não ser representativos em escalas piloto e industrial, de modo que dados empíricos, obtidos em laboratório, podem ocasionar erros no projeto do reator ou na estratégia para o controle do processo (DURAND, 2003).

### **2.6.2. Reatores de leito fixo**

A operação normal de biorreatores de leito fixo para FES envolvem substrato estático com aeração forçada através do fundo do reator. Devido à natureza sólida do substrato utilizado neste sistema, é difícil de misturá-lo eficientemente, e como consequência disto, são

estabelecidos gradientes significativos de gás, umidade e temperatura ao longo do fermentador, e por isso a FES é considerada mais complexa que a FSm. Comparando os dados disponíveis na literatura a respeito da FSm, pouco ainda é conhecido sobre fermentadores e especialmente de fermentadores de larga escala operados em FES. Este fato limita muito o desenvolvimento de reatores em larga escala (ASHLEY, MITCHELL, HOWES, 1999).

Os reatores de leito fixo, entre eles o reator de bandejas e o tubular de leito empacotado, são recomendados para processos em que a agitação possa ser danosa ao substrato, ao microrganismo ou ao produto. Entretanto, têm como inconveniente a não homogeneidade térmica e a possibilidade de ocorrência de regiões com baixa aeração, afetando a taxa, a velocidade e a seletividade das reações (ASHLEY, MITCHELL, HOWES, 1999). Em biorreatores de leito fixo com aeração forçada, é possível a utilização de leito fermentativo de maior altura, no qual a aeração forçada desempenha papel muito importante na remoção do calor. Por exemplo, biorreatores com leito fixo com 40 cm de altura são utilizados rotineiramente na indústria de *Koji* (SATO, SUDO, 1999).

A remoção de calor por evaporação pode ser o melhor mecanismo e em muitos casos a água evaporada pode ser reintegrada durante o processo (GUTIERRES-ROJAS *et al.*, 1996). A necessidade de adição de água é devido aos efeitos das variáveis operacionais na taxa de evaporação e na faixa de umidade que sustentam o crescimento do fundo e a formação de produtos.

Em reator de leito fixo, o oxigênio não é fator limitante, devido à aeração forçada. Este tipo de reator é afetado pela velocidade superficial do ar e remoção do calor através do resfriamento convectivo evaporativo. A diminuição do conteúdo de água do substrato afeta a transferência de massa dentro do leito fermentativo, causando a secagem do meio. Este fenômeno afeta diretamente a cinética metabólica do microrganismo (RAHARDJO, TRAMPER, RINZEMA, 2006).

A transferência de massa neste tipo de reator depende do tamanho da partícula do substrato, da taxa de crescimento do micélio do fungo, da vazão de ar de alimentação e da altura do leito fermentativo (MITCHELL *et al.*, 2004).

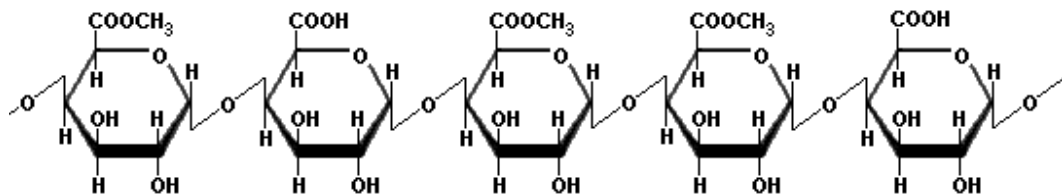
Outra dificuldade a ser considerada em leitos fixos é que, devido ao tempo do processo, muitas vezes não ser suficiente para que o sistema alcance o equilíbrio higroscópico com o ar, ocorre segregação de umidade ao longo do leito, havendo acúmulo na parte superior do mesmo, conforme observado por Dorta e Arcas (1998). Em processos fermentativos para obtenção de enzimas, esta variação axial de umidade pode promover a heterogeneidade na produção e na atividade enzimática no meio (GHILDYAL *et al.*, 1994).

O calor produzido durante a fermentação dentro do leito fermentativo é a maior limitação neste tipo de sistema fermentativo. Contudo, a redução do conteúdo de água no substrato aumenta seu endurecimento do meio sólido e conseqüentemente isto provoca a diminuição da penetração da hifa dentro do substrato, causando a redução de formação de produto. Neste tipo de reatores pode ser mantida a temperatura ótima de crescimento do microrganismo, e conseqüentemente, o microrganismo não vai sofrer com as variações de temperatura. Durante o pico de aquecimento a temperatura pode alcançar valores entre 10 °C ou mais acima da temperatura ótima (KHANAHMADI, *et al.*, 2006; GHILDYAL *et al.*, 1994).

O reator tubular de leito empacotado envolve um leito fixo sustentado por uma base perfurada, através da qual o ar é soprado. Para tentar manter constante a temperatura do substrato, tal leito normalmente é refrigerado pela parede do tubo, o que se caracteriza como problema para a ampliação de escala, uma vez que aumentando-se a dimensão radial, afasta-se o contorno refrigerado. O reator de leito tubular apresenta como vantagem permitir melhor controle dos parâmetros de processo do que no reator de bandejas (ASHLEY, MITCHELL, HOWES, 1999).

## 2.7. Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são macromoléculas complexas, de alto peso molecular, carregadas negativamente e constituídas principalmente por ácidos galacturônicos ligados por ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  (Fig. 2.1), sendo os maiores componentes da lamela média, na forma de pectato de cálcio e pectato de magnésio (KASHYAP *et al.*, 2001).



**Figura 2.1.** Estrutura primária de substâncias pécticas.

As substâncias pécticas consistem principalmente de galacturonas e ramnogalacturonas cujo carbono C-6 do galactato é oxidado a grupo carboxil. O grupo carboxila do ácido

galacturônico pode ser esterificado com grupo metil e, parcial ou completamente, neutralizado por íons de sódio, potássio ou amônia. Alguns dos grupos hidroxila no C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> podem ser acetilados. A cadeia primária consiste de unidades de  $\alpha$  - D – galacturonato ligadas  $\alpha(1\rightarrow4)$  (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

A sociedade americana de química classificou as substâncias pécticas dentro de quatro principais tipos (KASHYAP *et al.*, 2001):

- i) **Protopectina:** substância péctica insolúvel em água, presente em tecidos intactos.
- ii) **Ácido Péctico:** substância solúvel em água, formada por polímero de galacturonas que contém quantidade insignificante de grupos carboxila esterificados com grupo metil.
- iii) **Ácido Pectínico:** são cadeias de poligalacturonas com até 75% de unidades de galacturonatos metilados.
- iv) **Pectina:** é o nome genérico de misturas pécticas que contém ácido pectínico como principal componente.

## 2.8. Enzimas pectinolíticas

As pectinases são enzimas hidrolíticas despolimerizantes com atividade endo e exo. As endo-PGs são enzimas importantes envolvidas no amadurecimento das frutas e no ataque de fungos e bactérias a plantas, e são comumente utilizadas no tratamento de certos vegetais e frutas (FAVELA TORRES *et al.*, 2006).

As pectinases são produzidas por diferentes microrganismos, tais como fungos e bactérias (PATIL, DAYANAND a,b, 2006; DINU *et al.*, 2007). Porém, *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomuces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* têm sido os gêneros mais utilizados nos últimos 15 anos.

Segundo Favela Torres e colaboradores (2006), a seleção do microrganismo a ser utilizado para a produção de PGs depende de vários aspectos, como o tipo de cultura (FES ou FSm), número e tipo de pectinases produzidas (esterases, despolimerizantes hidrolíticas e despolimerases), pH e a estabilidade térmica da enzima, características genotípicas da espécie (selvagem, mutante, recombinantes homólogos o heterologos) .

Recentemente Jacob e colaboradores (2008) relataram a produção de pectinases por actinomicetes (*Streptomyces lydicus*) isolados de estuários e áreas marinhas. Anteriormente Piret e Demain (1988) relataram a utilização das pectinases produzida por este grupo

microbiano para a degradação de resíduos de plantas. Estas enzimas pectinolíticas são principalmente constituídas por pectato liases (SPOONER, HAMMERSCHMIDT, 1989).

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes nos materiais vegetais. A classificação destas enzimas é baseada nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos. São descritos três grupos de enzimas: as protopectinases, as esterases (pectinesterases) e as despolimerases (hidrolases e liases) (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005).

**Protopectinases:** são enzimas que degradam a protopectina insolúvel gerando a pectina polimerizada altamente solúvel.

**Esterases:** catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico. A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase. As pectinesterases (PE) são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais.

**Despolimerases:** catalizam a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre os monômeros do ácido D – galacturônico da cadeia de galacturonana. Essas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise (poligalacturonase), catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminação (liases), quebrando a ligação glicosídica por reação de transeliminação do H, formando dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 do ácido galacturônico.

As despolimerases podem ser subdivididas em 4 categorias diferentes, dependendo da preferência da enzima pelo substrato:

**Liases (Pectina liases – PL):** são enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio. Estas enzimas são subdivididas em dois tipos, as endo liases, que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  da pectina e as exo liases, que catalisam a ruptura das ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora.

As liases que têm preferência por ácido péctico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação) são denominadas poligalacturonato liases (endo ou exo), enquanto aquelas que atuam preferencialmente no ácido pectínico são as polimetilgalacturonato liases (endo ou exo).

**Hidrolases (Poligalacturonases – PG):** são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  da cadeia de ácido poligalacturônico. As Endo-poligalacturonase hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  internas de forma randômica, causando a despolimerização da



molécula e liberando oligômeros de ácidos poligalacturônico, enquanto as Exopoligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico. As hidrolases, em relação a especificidade e a esterificação do substrato são também classificadas em poligalacturonases, que têm preferência pelo substrato desmetoxilado (ácido péctico) e em polimetilgalacturonases, que têm preferência pelo substrato altamente metoxilado (ácido pectínico).

As endo – PGs são amplamente distribuídas entre os microrganismos. Elas têm sido relatadas em várias espécies fúngicas, incluindo *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium italicum*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* sp, *Thermomyces lanuginosus*, *Sporotrichum thermophile* (HASUNUMA, FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2003; SATHISH-KUMAR, PALANIVELU, 1999; KAUR, KUMAR, SATYANARAYANA, 2004; JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005).

Em contraste, as exo – PGs ocorrem com menos frequência e têm sido reportadas em *A. niger*, *Trichoderma viride*, *R. stolonifer*, *F. oxysporum*, *Penicillium viridicatum*, *Thermoascus aurantiacus*. As exo – PGs podem ser diferenciadas em exo – PGs fúngicas, que liberam ácido monogalacturônico e em exo – PGs bacterianas, que produzem ácido digalacturônico como principal produto final (SILVA *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2002; JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005).

O conhecimento sobre as propriedades bioquímica das PGs faz sentido com relação ao fato de que essas enzimas são usadas em diferentes aplicações biotecnológicas.

A estabilidade térmica e a estabilidade das pectinases são de grande importância do ponto de vista biotecnológico. No caso de leveduras, a temperatura ótima de atuação das PGs é de 40-50 °C. Porém, algumas leveduras (*Tephrosia cândida* e *Kluyveromyces fragilis*) produzem PGs com atividade máxima acima de 60 °C (BLANCO, SIEIRO, VILLA, 1999). As PGs produzidas por fungos são geralmente ácidas e tem atividade ótima acima de 50 °C. No entanto, algumas linhagens de *Thermoascus aurianticus* (MARTINS *et al.*, 2002), *Aspergillus aculeatus* (FODA *et al.*, 1984) e *Fusarium oxysporum* (VÁZQUEZ, PATIÑO, MARTÍNEZ, 1993) produziram PGs com atividade ótima entre 60 e 65 °C. A atividade ótima das PGs produzidas por bactérias como o *Streptomyces* sp. QG-11-3 é de 60 °C e da bactéria hipertermofílica *Thermotoga maritima* é de 80 °C (KLUSKENS *et al.*, 2005). Outros exemplos de temperatura e pH ótimos de pectinases podem ser citados, *Pleurotus ostreatus*, 50 °C e 7,0 (FREIXO, KARMALI, ARTEIRO, 2008); *Aspergillus sojae* 55 °C e 4,0 (DOGAN, TARI, 2008); *Sclerotium rolfsii*, 60 °C e 5,0 (SCHNITZHOFER *et al.*, 2007).

Fazendo um resumo na literatura de algumas dessas propriedades de PGs obtidas de um grupo de fungos, foi observado que *Aspergillus japonicus* (HASUNUMA, FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2003), *Sporotrichum thermophile Apinis* (KAUR, KUMAR, SATYANARAYANA, 2004), *Mucor flavus* (MARGO *et al.*, 1994), *Aspergillus niger* (SINGH, RAO, 2002), *Aspergillus awamori* (NAGAI *et al.*, 2000), *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 (SAITO, TAKAKUWA, ODA, 2004), *Aspergillus sojae* (DOGAN, TARI, 2008) e *Mucor rouxii* NRRL 1894 (SAAD *et al.*, 2007) apresentam temperatura ótima de atividade entre 30 – 60 °C, pH ótimo entre 3,0 – 5,5, temperatura de estabilidade entre 40 – 65 °C e pH de estabilidade entre 2,5 – 8,0.

O efeito de íons na atividade enzimática é outro fator importante. A literatura demonstra que é difícil prever como um íon vai atuar na atividade de uma enzima. A influência não só depende dos íons e da enzima e sim de outros fatores específicas (pH, temperatura, substrato, etc.) sendo a concentração do íon uns desses fatores mais importantes. A ativação ou inativação de uma enzima deve ser considerada para cada fator (MEDYANTSEVA, VERTLIB, BUDNIKOV, 1998).

Além da temperatura, a produção de enzimas por microrganismos é afetada por diversos outros fatores, como o tipo de processo fermentativo, tempo de incubação, tipo de substrato, umidade, concentração de oxigênio e pH que precisam ser considerados (SCANDURRA *et al.*, 1998).

## **2.9. Microrganismos termofílicos e produção de pectinases termoestáveis**

Muitos microrganismos apresentam a capacidade de se adaptar em ambientes que outras formas de vida não poderiam subsistir como os ambientes geotérmicos. Para essa adaptação à termofilia o microrganismo envolve a adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. Essas características, dos microrganismos e conseqüentemente as características das enzimas que os mesmos produzem, têm despertado o interesse do ponto de vista biotecnológico para a obtenção e aplicação das mesmas (COLOMBATTO *et al.*, 2004).

A temperatura é o fator que mais influencia o funcionamento de moléculas e manutenção das estruturas biológicas. Em temperaturas elevadas, as reações químicas e enzimáticas na célula ocorrem mais rapidamente e o crescimento microbiano é por conseqüência mais rápido e acentuado. No entanto, sob temperaturas mais altas que a

temperatura ótima para o crescimento do microrganismo, as proteínas, os ácidos nucléicos e outros componentes celulares podem ser danificados de modo irreversível (MADIGAN *et al.*, 2003).

A maioria dos microrganismos atualmente conhecida pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção, ou a persistência, de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Estes organismos são chamados de termófilos ou termofílicos e são classificados em (MADIGAN *et al.*, 2003):

- a) Termofílicos: correspondem a microrganismos com faixa de crescimento entre 20° e 55 °C, sendo as temperaturas ótimas para o crescimento entre 40 e 50 °C. Nesse grupo estão incluídos procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea e eucariotos (fungos filamentosos);
- b) Termofílicos extremos: que são microrganismos capazes de crescer em temperaturas entre 65° a 85°C. Esse grupo é representado pelos procariotos dos Domínios Bactéria e Archaea;
- c) Hipertermofílicos: correspondem a Arqueobactérias com capacidade de crescer a 85° até 110°C.

Os microrganismos termofílicos apresentam algumas adaptações que permitem o seu crescimento sob altas temperaturas. Suas enzimas e proteínas são muito mais estáveis ao calor que as presentes nos microrganismos mesofílicos e atuam otimamente sob altas temperaturas (PELCZAR *et al.*, 1996)

Entre os eucariotos, poucas espécies conseguem crescer entre 45° a 55°C. Essa maior termoestabilidade deve-se mais ao seu sistema de membrana, do que a termoestabilidade enzimática. Apenas 30 espécies de fungos, entre as 50.000 descritas, crescem entre 40° e 45°C, embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60° e 62°C (MAHESHWARI, BHARADWAJ, BATH, 2000).

O fungo termofílico *Mucor pusillus* foi isolado há um século, quando Hugo Miehe estudou a microflora de pilha de compostagem de resíduos agrícolas. O autor comparou a capacidade de gerar calor de fungos termofílicos e mesofílicos, avaliando o aumento da temperatura do material sólido inoculado com culturas mesofílicas e termofílicas, e demonstrou que a temperatura máxima de aquecimento durante a fermentação depende da temperatura máxima de crescimento da linhagem (MAHESHWARI, BHARADWAJ, BATH, 2000).

As temperaturas elevadas só são encontradas na natureza em algumas áreas restritas, como regiões vulcânicas e fontes termais. Fora desses ambientes, são observadas em solos completamente expostos à luz solar, onde a temperatura pode chegar a 50°C, e em pilhas de material em decomposição, cuja temperatura pode atingir até 80°C (VIEILLE, ZEIKUS, 2001).

Os fungos termofílicos desenvolvem-se em processos de compostagem durante a fase de alta temperatura (acima de 40°C), que sucede a microflora mesofílica. Num processo de compostagem pode-se distinguir três fases: na primeira fase, a microbiota mesofílica cresce com rapidez e assimila, de preferência, as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros de mais fácil acesso. Nesta fase há geração de calor através das reações metabólicas exotérmicas, elevando a temperatura até 40°C. Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos mesofílicos e estimula a germinação dos esporos dos fungos termofílicos, iniciando a segunda fase do processo. Nessa etapa, as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis já estariam exauridas, restando os polissacarídeos constituintes da biomassa, como a celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. O resultado desse processo é a degradação do material vegetal a polímeros menores e aumento da temperatura para próximo de 60°C. A terceira fase do processo caracteriza-se pela inibição do crescimento dos fungos e redução de atividade bioquímica no material (MAHESHWARI, BHARADWAJ, BATH, 2000).

Espera-se que fungos termofílicos decompositores de material vegetal produzam pectinases, embora poucos fungos termofílicos pectinolíticos tenham sido isolados (MAHESHWARI, BHARADWAJ, BATH, 2000). Alguns fungos termofílicos não conseguem utilizar a celulose como fonte de carbono, como *T. lanuginosus*, *Talaromyces duponte* e *M. pusillus*. Os organismos que não degradam a celulose podem crescer comensalmente utilizando açúcares liberados por outros organismos que degradam o polímero. Por outro lado, a incapacidade de hidrólise em determinado polímero como celulose, não significa que o fungo não tenha sistema enzimático para hidrólise de outro polímero. Alguns fungos como *Humicola insolens* não degradam celulose, mas são capazes de usar a xilana como fonte de carbono, crescendo melhor sobre esse polímero do que em meio com açúcares mais simples (SINGH, PILLAY, PRIOR, 2000).

Nos últimos anos, houve aumento significativo no interesse de produção de enzimas termofílicas, devido ao grande potencial biotecnológico que apresentam. Elas têm sido usadas em biologia molecular (como a Taq polimerase), adicionadas em detergentes (proteases) e nas indústrias de processamento do amido ( $\alpha$ -amilase, glicose-isomerase) e são potencialmente capazes de atuar em outros processos que requerem altas temperaturas (VIEILLE, ZEIKUS, 2001).

Recentemente Martin (2006) isolou várias linhagens fúngicas termofílicas (*Thermomyces* sp, *Aspergillus* sp, *Scopulariopsis* sp, *Rhizomucor pusillus*, *Chaetomium* sp, *Neosartorya* sp, entre outras) a partir de compostagem de lixo urbano e pilhas de bagaço de cana de açúcar,

apresentando atividades pectinolíticas variada.

A produção de pectinases microbianas tem sido muito estudada, porém, a maioria das pesquisas tem focado a produção destas enzimas por linhagens fúngicas mesofílicas (CASTILHO, ALVES, MEDRONHO, 1999; COURI *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002). Poucos relatos são apresentados na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas (MAHESHWARI, BHARADWAJ, BATH, 2000; MARTINS *et al.*, 2002, PHUTELA, DHUNA, SANDHU, 2005; KAUR, KUMAR, SATYANARAYANA, 2004; FREITAS *et al.*, 2006). De acordo com Patil e Dayanad (2006a, b) e Ustok, Tari, Gogusb (2007) as enzimas pectinolíticas são produzidas por fungos filamentosos, sendo preferidas espécies de *Aspergillus* entre eles, *Aspergillus niger* e *Aspergillus sojae*

Badhan e colaboradores (2007) produziram enzimas xilanolíticas e celulolíticas com o fungo termofílico *Myceliophthora sp.* IMI 387099, utilizando palha de arroz como substrato.

## **2.10. Aplicação de pectinases microbianas**

Através dos anos, as pectinases têm sido utilizadas em vários processos industriais, como o têxtil, papelero, chá, café, extração de óleo, tratamento de efluentes líquidos e outros materiais contendo pectina (SALAZAR, JAYASINGHE, 1999; REID, RICHARD, 2004). Entre as aplicações, a mais tradicional e a que envolve a maior quantidade de enzima é na extração e processamento de suco de frutas tropicais tais como a manga, mamão, banana, carambola e goiaba, que contêm níveis variados de carboidratos estruturais e não-estruturais, além de apresentarem diferenças na textura durante a maturação e estocagem (LAZAN, ALI, 1993; CHIN, ALI, LAZAN, 1999).

Além de melhorar a extração, estas enzimas contribuem para a diminuição da viscosidade e da turbidez dos sucos. Mistura de pectinases e amilases são utilizadas para este efeito, sendo que a ação desta combinação pode diminuir em 50% o tempo do processo de filtração (BLANCO, SIEIRO, VILLA, 1999). Em produtos clarificados, a aparência clara e homogeneidade do suco são características importantes, as quais são alcançadas pela remoção de grande parte dos sólidos suspensos. Os sólidos suspensos são principalmente constituídos por polissacarídeos (pectinas, celulose, hemicelulose, lignina, e amido), proteínas, taninos e microrganismos (VAILLANT, *et al.*, 2001; SIN *et al.*, 2006).

Na área comercial é chamada pectinase a mistura de três diferentes enzimas: a PG (poligalacturonas), PE (pectina esterase) e PL (pectina Liase) (SUNNOTEL; NIGAM, 2002). A combinação das pectinases com celulases, arabinases e xilanases aumenta a eficiência da extração de sucos durante a prensagem por romperem a parede celular (GAILING, GUIBERT, COMBES, 2000; ALKORTA *et al.*, 1998). Na Tabela 2.5 são apresentados exemplos de pectinas comerciais aplicadas a diferentes processamentos de frutas.

**Tabela 2.5.** Exemplos de enzimas comerciais contendo pectinas, aplicadas em diferentes processamentos de frutas.

<b>Autor</b>	<b>Enzima Comercial</b>	<b>Microrganismo produtor</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Aplicação</b>
Brasil, Maia, Figueiredo, (1995)	Clarex-L	-	Clarificação	Suco de goiaba
Bhattacharya, Rastogi (1998)	Novo Pectinex 3XL	-	Propriedades reológicas	Polpa de manga
Vaillant et al, (1999)	Cytolase CL; Rapidase Press	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ; <i>A. niger</i>	Clarificação	Suco de maracujá
Demir (2001)	Röhapect D5S e Pectinol A1	<i>A. niger</i>	Clarificação	Suco de maçã
Demir (2001)	Pectinex Ultra SP-L	<i>A. aculeatus</i>	Redução de viscosidade	Purê de cenoura
Landbo, Kaack, Meyer, (2007)	Pectinex BE Color	<i>Aspergillus</i> clonado	Turbidez, clarificação e rendimento do suco	Polpa de elderberry ( <i>Sambucus nigra L</i> )
Abdullah <i>et al.</i> , (2007)	Pectinex Ultra SP-L,	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Turbidez, clarificação, viscosidade e cor	Suco de carambola
Aliakbarian et al., (2008)	Uvazym Extra, Maxoliva, Uvazym Couleur	-	Extração de ácidos graxos	Óleo de oliva

Vinhos tratados com enzimas pectinolíticas apresentam melhores características em relação à cor e à estabilidade, especificamente vinho vermelho (REVILLA; GONZALEZ-SAN JOSE, 2003).

Enzimas podem melhorar o tempo de processo, rendimento de extração de óleo e a qualidade final do produto. Para a melhor separação do óleo-água precisa-se de pectinases e proteases. Através a ação das duas enzimas, obtém-se a fácil separação do óleo na fase aquosa. Exemplo disso é o óleo extraído a partir de limão, uma vez que as pectinases destroem as propriedades emulsificantes da pectina, extraindo o óleo da casca (SCOTT, 1978).

Pectinases em conjunto com amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas têm sido empregadas para remover agentes de aderência do algodão e remoção de impurezas não celulósicas das fibras, resultando em processamentos ecologicamente corretos, substituindo a utilização de soda cáustica (HOONDAL *et al.*, 2000). A degomagem de fibras (rami, juta), objetiva liberar as fibras antes a sua utilização na indústria têxtil. Pectinases são também usadas na maceração de linho, para separar fibras eliminando pectina (HOONDAL *et al.*, 2000; KAPOOR *et al.*, 2001).

A adição de pectinases em efluentes industriais resultantes de processamentos de vegetais, auxiliam na degradação de material pectinolítico, facilitando assim, a degradação da matéria orgânica durante o processo de lodo ativado (HOONDAL *et al.*, 2000).

Durante a fabricação do papel, a pectinase pode despolimerizar pectinas e subseqüentemente, diminuir agentes branqueadores utilizados (VIKARI, TENAKANEN, SUURNAKKI, 2001).

Pectinases, juntamente com outras enzimas, são empregadas na produção de alimentos para animais. Atua reduzindo a viscosidade do alimento, aumentando a absorção de nutrientes liberados, além da liberação de polímeros biodegradáveis que normalmente aparecem presos às fibras (HOONDAL *et al.*, 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar a produção de pectinases em FES pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frasco e biorreator de bancada de leito fixo.

#### 3.2. Específicos

- Avaliar o perfil enzimático produzido em FES em escala de frascos pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com ênfase nas pectinases, utilizando biomateriais tais como bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos.
- Fazer fermentações em biorreator de bancada de leito fixo (condições obtidas na escala de frasco) para avaliar os perfis de produção de exopectinase, umidade e temperatura durante o processo. Foram ensaiadas várias condições de processo (temperaturas, vazões de ar e arquitetura do reator).
- Comparar as características físico-químicas da exo e endo-pectinase produzidas, assim como a produtividade enzimática em ambas as escalas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de FES em frascos erlenmeyer foram feitos no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e os realizados em reator de bancada no Laboratório de Medidas Físicas, ambos da UNESP da São José de Rio Preto.

### 4.1. Microrganismo

Martín (2006) isolou de pilha de bagaço de cana de açúcar o fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31. O fungo demonstrou ser bom produtor de pectinase em FES e foi utilizado neste trabalho.

A cultura do fungo *Thermomucor seudaticae-indaticae* N31 foi mantida em meio de Sabouraud com 3% de pectina, sob óleo mineral em temperatura ambiente.

### 4.2. Meios de cultivo

#### 4.2.1. Meio nutriente

Foi utilizado o meio nutriente descrito por Mandels, Sternberg (1976) com pequena modificação: 1% de pectina (Kelco) com 64 – 72% de esterificação; 0,2% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,5% de solução de elementos traços (2,2% de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,1% de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,5% de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5% de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,16% de  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,16%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,11% de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 5% de EDTA).

#### **4.2.2. Temperatura ótima de crescimento do fungo**

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi incubado no meio saboraud em temperaturas de 27, 35, 40, 45, 50 e 55 °C, medindo-se o diâmetro do halo da colônia formada em intervalo de 24 horas.

#### **4.2.3. Meio para processo fermentativo**

Na fermentação foram usados como substratos farelo de trigo, adquirido no mercado local, bagaço de cana-de-açúcar fornecido pela Usina de Açúcar e Álcool São Domingos de Catanduva – SP e bagaço de laranja, fornecido pela Bascitrus S/A de Mirassol – SP.

O bagaço de laranja e de cana de açúcar foram lavados com água corrente (várias vezes até esgotar o açúcar livre presente), secados a 65 °C, moídos e peneirados usando peneira para seleção de partículas 0,1 entre 0,5 mm e estocado em câmara frigorífica, já o farelo de trigo foi utilizado diretamente (sem tratamento).

As misturas utilizadas foram homogeneizadas e esterilizadas em autoclave a 121° C, por 30 minutos.

#### **4.3. Processo fermentativo em frasco erlenmeyer**

A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g do substrato (40% farelo de trigo, 40% casca de laranja, 20% bagaço de cana) a 70% de umidade segundo Martin (2006) realizou várias combinações de substratos para a produção de pectinase, sendo esta combinação uma das que apresentou a melhor produção. O material foi inoculado com 5 mL de suspensão micelial ou de esporos em solução nutriente (0,2% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), com 0,5% de solução de elementos traços descrito no item 4.1.1. Foram empregados 30 erlenmeyers para 15 dias de fermentação. Os frascos foram mantidos em câmeras climáticas BOD a 45 °C. Diariamente dois frascos eram retirados da câmara BOD e utilizados para a análise da produção de enzimas. Para tanto, em cada frasco foram

adicionados 40 mL de água destilada, sendo, após homogeneização, agitado por 30 min em shaker a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 10000xg durante 15 min a 5° C e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

#### **4.4. Medida da atividade de poligalacturonases (PG)**

A atividade da exo-poligalacturonase foi avaliada numa mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato 0,2 M pH 5,0, contendo 1% de pectina (Kelco) com 64% – 72% de esterificação, e 0,2 mL de solução enzimática bruta. A substância redutora liberada (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura de reação a 60° C por 10 min., foi quantificada pelo método do DNS (3,5 – ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu$ mol substância redutora expressa como de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

A atividade de endo-PG foi determinada através da medida da redução da viscosidade de solução de pectina após reação enzimática. Foram incubados 2 mL de extrato enzimático bruto com 6mL tampão acetato 0,2M pH 5,0, contendo pectina, de forma que a concentração final do substrato fosse de 3%. As misturas de reação foram incubadas por 10 min a 60 °C. A viscosidade da mistura de reação foi determinada aplicando-se no viscosímetro de cilindros concêntricos Basic da Fungilab em temperatura de 25 °C. O controle foi feito usando mistura de enzima inativada, tampão e pectina em igual proporção à da amostra, e foram feitas medidas de viscosidade de forma similar à do extrato enzimático bruto. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% a viscosidade da solução nas condições de ensaio.

#### **4.5. Medida da atividade de Xilanase**

A atividade enzimática da xilanase foi determinada numa mistura contendo 0,9 mL de substrato (solução 0,5% de xilana Birchwood-Sigma em tampão acetato 0,2 M em pH 5,0) e 0,1 mL da solução enzimática bruta, incubada por 10 min a 60 °C. A substância redutora liberada foi quantificado pelo método do DNS. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade

de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de substância redutora expressa como xilose por minuto nas condições de reação, utilizando curva padrão de xilose.

#### **4.6. Medida da atividade de Avicelase e CMCCase**

A atividade da avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao da xilanase, substituindo-se o substrato por solução de avicel (Sigma Co) a 0,5% e a substância redutora quantificada a partir de curva padrão de glicose. O mesmo procedimento foi utilizado para detectar a atividade da CMCCase, exceto que o substrato utilizado foi solução de CMC (carboximetilcelulose Sigma Co). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de substância redutora expressa como glicose por minuto nas condições de reação, usando curva padrão de glicose.

#### **4.7. Medida da atividade Amilase**

A atividade da amilase foi determinada por procedimento idêntico ao da xilanase, utilizando-se solução de amido a 0,5% e a substância redutora quantificada a partir de curva padrão de glicose. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de substância redutora expressa como glicose por minuto nas condições de reação, utilizando curva padrão de glicose.

#### **4.8. Medida de Manganês peroxidase**

A atividade de Manganês peroxidase (MnP) na solução enzimática bruta foi determinada a 60°C, numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio a 0,05M (pH 4,5), 0,1 mL de solução de  $\text{MnSO}_4$  a 0,4M e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio a 40  $\mu\text{M}$  e a absorbância medida a 240nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a

quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Mn}^{+3}$  por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $8,1 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$  (GLENN *et al.*, 1986; AITKEN, IRVINE, 1990).

#### **4.9. Medida de Lignina peroxidase**

A atividade de Lignina peroxidase (LiP) na solução enzimática bruta foi determinada a  $60^\circ\text{C}$  numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão tartarato de sódio 0,05M (pH 3,5), 0,1 mL de solução de álcool veratrílico a  $40 \mu\text{M}$  e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310nm. Uma unidade de atividade de enzima (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu\text{mol}$  de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $9,3 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$  (TIEN, KIRK, 1988).

#### **4.10. Avaliação da presença de micotoxinas**

No Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP de Piracicaba foram realizadas análises para determinar a presença de micotoxinas no meio fermentado e não fermentado (controle) pelo fungo *Thermomucor seudaticae-indaticae* N31. As análises foram feitas seguindo a metodologia de cromatografia em camada delgada descrito por Soares; Rodriguez-Amaya, 1989.

#### **4.11. Caracterização da exo-poligalacturonase do extrato bruto produzido em fermentação em erlenmeyer e em fermentador de bancada**

##### **4.11.1. Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima**

O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em tampões 0,2 M: acetato-NaOH (pH 3,0 a 5,5), citrato-NaOH (pH 5,5 a 7,0), tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5), sendo dosada a atividade a 60°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 a 80 °C, e a atividade foi medida no pH determinado como ótimo.

##### **4.11.2. Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH**

A enzima foi mantida por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 30 a 80 °C. Após esse período, foram tomadas alíquotas para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se a enzima em tampões 0,1M (1:1) com pH variando de 2,5 a 9,5, em ausência de substrato, a 25 °C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade da enzima.

##### **4.11.3. Estabilidade da exo-PG a 60 °C na ausência de substrato**

O extrato enzimático bruto foi mantido a 60 °C por um período 10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos respectivamente. Após esse período, foram tomadas alíquotas para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

#### **4.12. Caracterização físico química da Endo-poligalacturonase**

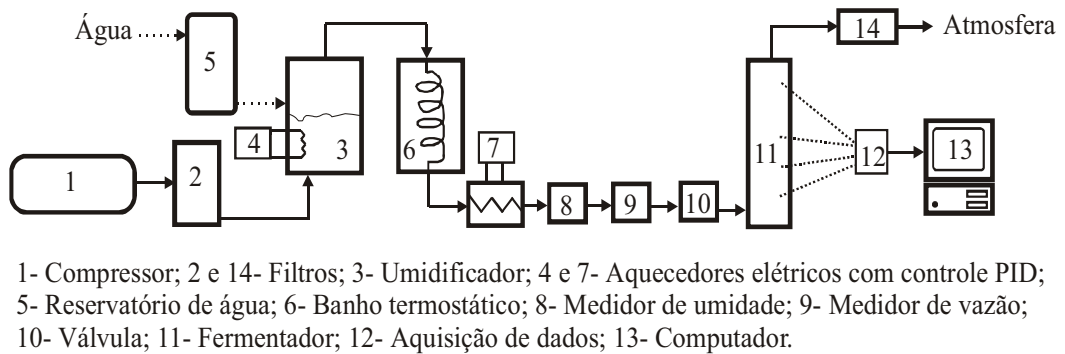
A caracterização físico-química da endo-poligalacturonase foi feita como descrito nos itens, 4.11.1, 4.11.2 e 4.11.3.

#### **4.13. Estudo do efeito de diferentes compostos sobre a atividade da exo-poligalacturonase**

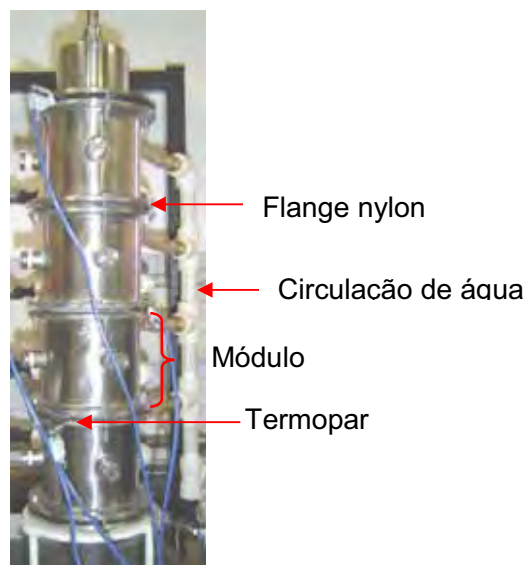
Para o estudo da influência de íons sobre a atividade da exo-PG, 100 $\mu$ L do extrato enzimático bruto foi incubado por 5 minutos com 20 $\mu$ L das seguintes soluções, todas a 5 mM: Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> na forma de sulfato ou cloreto, assim como, para influência do EDTA,  $\beta$ -mercapto etanol, 1% de trealose e glicerol e 0,5% dos detergentes tween 20, tween 80, triton x-100, SDS (Duodecil sulfato de sódio). Após esta reação, foi utilizado este extrato para a quantificação da atividade de exo-PG descrita em 4.4.

#### **4.14. Fermentador de leite fixo**

O reator em leite fixo (Figuras 4.1 e 4.2) era feito de aço-inóx e composto por módulos. Cada módulo era feito de dois cilindros concêntricos, tendo o interno 7 cm de diâmetro e o externo 9,5 cm, ambos de 10 cm de comprimento. No espaço anular entre os tubos circulou água para refrigerar o sistema, mantida na temperatura desejada por banho termostático. Alguns ensaios foram feitos com quatro módulos e outros com seis módulos, conforme será identificado no local apropriado. Entre dois módulos consecutivos foram colocados flanges de nylon de 5 mm de espessura.



**Figura 4.1.** Diagrama geral do biorreator de leito fixo.



**Figura 4.2** Biorreator de bancada utilizado na FES.

O ar utilizado no fermentador era fornecido pelo compressor de ar radial. O ar passou por rotâmetros para a medição de sua vazão e foi filtrado para a retirada de impurezas mais grosseiras. Após a filtração o ar foi umidificado num sistema constituído por dois recipientes hermeticamente fechados, preenchidos com esferas de vidro de 3 mm de diâmetro e água destilada, interconectados entre si, sendo o ar obrigado a percolar ambas as colunas. Estes recipientes encontravam-se mergulhados em banho a 37°C.



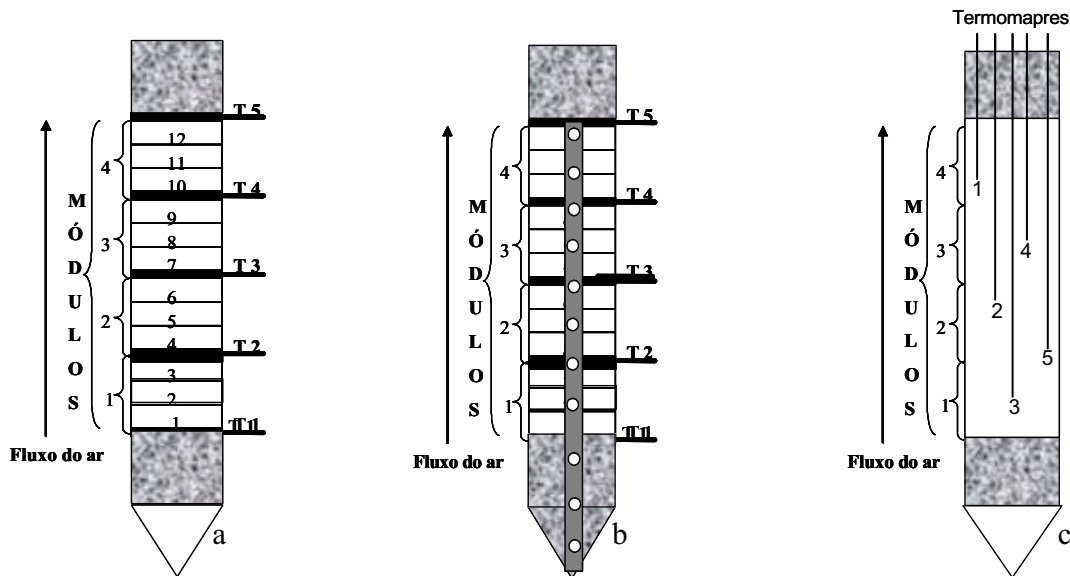
Após ser saturado, o ar passou por aquecedor elétrico, de onde saiu a 45°C. O sistema de aquecimento era constituído de cápsula de PVC, que no seu interior possuía resistência elétrica de 30  $\Omega$  conectada a uma fonte de tensão de corrente contínua. O ar aquecido e umidificado foi filtrado novamente para evitar a contaminação do fermentador. A filtração era feita com filtro cilíndrico de aço inox preenchido com lã de vidro. Para evitar a queda da temperatura do ar durante a filtração, o filtro era mergulhado em banho termostático a 45°C. Após a filtração o ar ingressou no fermentador.


Foram monitoradas as temperaturas longitudinais e axiais do reator durante o processo (Figura 4.3 a, b e c), a fim de observar as prováveis variações de temperatura decorrentes da fermentação e analisar o comportamento térmico do sistema ao longo do reator.

A coleta de dados foi realizada através de sistema de aquisição de dados computadorizado NATIONAL DAQ, gerenciado pelo Software Labview 8.1. (National Instruments, 2008). Foram monitoradas as temperaturas longitudinais e axiais do reator durante o processo, a fim de observar as prováveis variações de temperatura decorrentes da fermentação e analisar o comportamento térmico do sistema ao longo do reator.

Os termopares eram de cobre-constantan, com bainhas de aço inox de 1,5mm de diâmetro. Foram adotadas duas estratégias de inserção dos termopares, uma radial e outra longitudinal. Na alternativa de inserção radial, os termopares foram dispostos em cada módulo como mostra a Figura 4.3 a e b, totalizando cinco sensores, já os termopares longitudinais foram inseridos na parte superior do reator (Figura 4.3 c).

Foram adotadas duas estratégias para a entrada do ar no sistema, a serem denominados alimentação longitudinal e alimentação radial. Na alimentação longitudinal o ar entrava através de um cone contendo esferas de vidro (testes com 4 módulos) ou bagaço de cana umidecido (testes com 6 módulos), já na alimentação radial, o ar era inserido através de um tubo centralizado perfurado (Figura 4.3 b).



**Figura 4.3.** a) Esquema de localização de termopares e de distribuição de seqüência de amostragem do meio poroso após fermentação (T: termopar;  bagaço de cana umidecido) e aeração longitudinal; b) aeração radial; c) aeração longitudinal e distâncias entre termopares (comprimento; distancia do centro-parede) 1. (5;1,8), 2. (20;3), 3. (35;0), 4. (25;3) e 5. (15;1,8).

#### 4.15. Preparação do substrato para fermentação

A fermentação no biorreator de leito fixo ocorreu com aproximadamente 250 g do substrato (40% farelo de trigo, 40% casca de laranja, 20% bagaço de cana) a 70% de umidade. O material foi inoculado com suspensão micelial e de esporos em solução nutritiva (0,2% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) com 0,5% de solução de elementos traços descrito no item 4.1.1. Esta inoculação foi feita em sacos de polipropileno contendo o substrato previamente esterilizado. Posteriormente este material foi empacotado assepticamente no reator.

#### 4.16. Processo fermentativo em reator de bancada

Para os testes preliminares foram feitas fermentações com 1, 2, 5 e 7 dias nas mesmas condições citadas inicialmente (item 4.15) a 45 °C com vazão de ar de 120L/h com 70% de umidade. Estas fermentações foram feitas com quatro módulos e foram monitorados os perfis de temperatura e, ao final do processo, foram obtidos os perfis de umidade e enzimático.

Após verificar que o melhor tempo de fermentação foi de um dia, fizeram-se testes nas mesmas condições anteriores, porém, com a umidade relativa do ar a 95%.

As variáveis de controle utilizadas durante os ensaios fermentativos foram: vazão volumétrica do ar (G), umidade relativa (UR) e temperaturas da camisa ( $T_c$ ) e de entrada do ar ( $T_{ar}$ ). Foi elaborado um planejamento estatístico fatorial completo para a análise dos dados, cujos níveis utilizados estão apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Planejamento dos experimentos de fermentação

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>	<i>Ensaio</i>		
		<b>Fatorial 3x2</b>	<b>DIC</b>	
Vazão do ar (G)	3	60, 120 e 180 l/h	120l/h	120l/h
Umidade relativa (UR)	1	0,95	0,95	0,95
Temperatura da camisa ( $T_c$ )	3	45°C	40	50
Temperatura do ar ( $T_{ar}$ )	3	40 e 45°C	40	50

Todos os experimentos foram feitos em duplicata. Foram monitoradas as temperaturas longitudinais do reator durante o processo, a fim de observar suas prováveis variações decorrentes da fermentação e analisar estas variações ao longo do reator. Após o término dos ensaios, foram avaliadas a umidade do meio e a atividade enzimática, para cada módulo, que foi subdividido em três alturas iguais a 3 cm, aproximadamente, como mostra a Figura 4.3 a.

A umidade do meio poroso foi feita pelo método do peso seco, colocando a amostra em estufa de convecção forçada a 105°C por 24 horas.

Para a obtenção do extrato enzimático retirou-se cerca de 5 gramas de material fermentado, e ao mesmo foi adicionado 20 mL de água destilada, sendo, após homogeneização, agitado por 30 min em shaker a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado

a 10000xg durante 15 min a 5 °C e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta. Como foi constada nos testes preliminares a ocorrência de um perfil de umidade dentro do leito fermentado, os cálculos de atividade enzimática são baseados em peso seco de substrato.

#### **4.17. Processos fermentativos complementares**

Após a verificação da ocorrência de perfil de umidade no substrato durante a fermentação, optou-se por adicionar dois novos módulos ao reator, totalizando 6 módulos. Nestes módulos adicionais (um na parte inferior e outro na parte superior do reator – Figuras 4.3) foi colocado bagaço de cana estéril umidificado ( $\pm 80\%$ ). O objetivo da adição dos novos módulos foi de avaliar o novo perfil de umidade do meio fermentado.

A fermentação ocorreu a 45° C, com umidade relativa do ar de 95% por 24 horas ou 48 horas, e a aeração foi feita radial e longitudinalmente. Nestas fermentações foram monitorados os perfis de temperatura, umidade e enzimático. O conjunto experimental é ilustrado na Figura 4.3.

Após o término dos ensaios, foram avaliadas a umidade do meio e a atividade enzimática, para cada módulo, que foi subdividido em três alturas iguais a 3 cm, aproximadamente. Das amostras colhidas do reator, num total de 12, foram feitos os ensaios para a determinação da atividade enzimática e de umidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Escolha do fungo para a FES

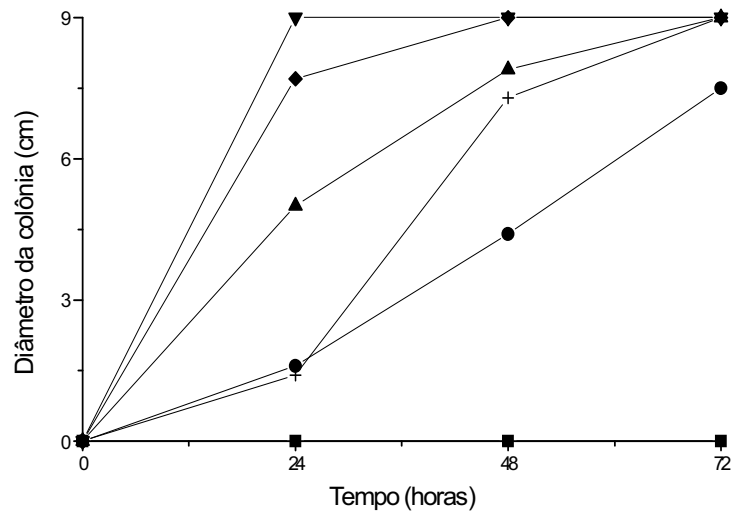
O *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresenta aspecto de colônia cotonosa marrom-acinzentada com crescimento e esporulação no substrato (tanto em meio gelatinoso como na FES) muito rápida (menos de 24 horas). Assim, com estas características e aliada à boa produção enzimática optou-se por esta linhagem fúngica para o desenvolvimento deste projeto.

Embora a literatura traga vários relatos sobre isolamento de fungos para a produção de PG por FES, como os trabalhos de Phutela, Dhuna e Sandhu (2005) que destacam uma linhagem termotolerante de *Aspergillus fumigatus*, Martins e colaboradores (2002) que estudaram a produção de pectinases em FES pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* 179-5 e recentemente o de Favela-Torres e colaboradores (2006), que compararam a produção de pectinase em FES e FSm com várias espécies de fungos, nenhum relato é encontrado sobre a produção de PG pelo fungo termofílico *Thermomucor*.

### 5.2. Determinação de temperatura ótima de crescimento do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em meio sólido

Na Figura 5.1 nota-se que as condições mais favoráveis ao crescimento do fungo foram acima de 35°C e abaixo de 55°C, sendo que na temperatura de 45°C o fungo atingiu o diâmetro máximo da placa de petri em apenas um dia, sendo, portanto, esta considerada a temperatura ótima. No entanto, seu comportamento a 50°C é semelhante aquele observado para 45°C, o que dá maior flexibilidade ao processo fermentativo, pois permite que o sistema de controle de temperatura no fermentador de leito fixo tenha uma faixa de atuação, de modo que, caso a geração de calor metabólico seja muito intensa, haja tempo hábil para que medidas corretivas possam ser tomadas para evitar que a produtividade do sistema seja afetada.

Com base nesses resultados, a temperatura de 45°C foi adotada para dar continuidade aos ensaios de fermentação.



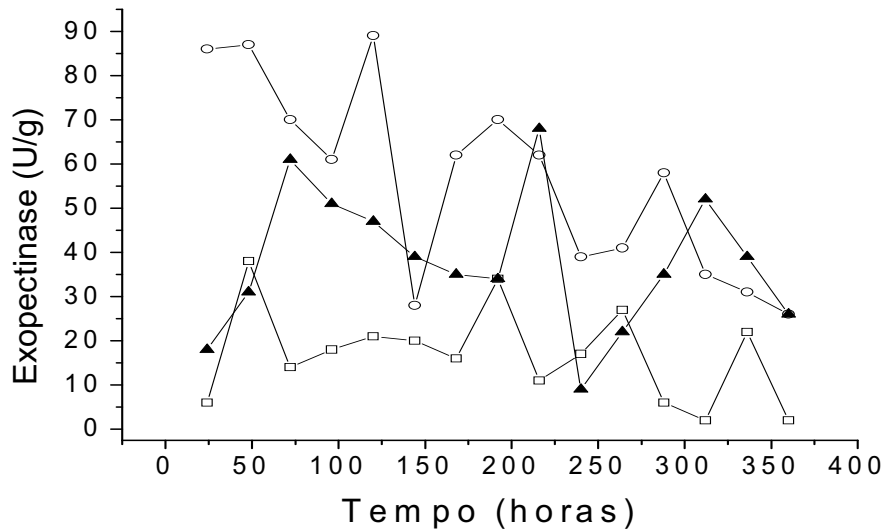
**Figura 5.1.** Crescimento do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em diferentes temperaturas. -■- 27°C; -●- 35°C; -▲- 40°C; -▼- 45°C; -◆- 50°C; -+- 55°C.

### 5.3. Produção de exo-PG em FES pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N 31, em diferentes teores de umidades

Martin (2006) testou várias proporções do substrato bagaço de cana, farelo de trigo e bagaço de laranja para a produção de pectinase em FES. A combinação de substrato de fermentação constituído por 40% de bagaço de laranja, 40% de farelo de trigo e 20% de bagaço de cana foi escolhida para a execução deste projeto. Optou-se por esta combinação principalmente porque o bagaço de laranja é rico em pectina (indutora de pectinase), o trigo enriquece de nutrientes o meio de fermentação, e o bagaço de cana por sua constituição fibrosa auxilia na aeração do meio de fermentação. A utilização deste último tem fundamental importância, visto que na segunda fase do aumento de escala de produção, utilizando-se fermentador de bancada, no qual a boa distribuição da aeração é fator fundamental para o bom desempenho do sistema (SILVA *et al.*, 2005).

Na Figura 5.2 pode-se observar que os perfis de produção da exo-PG foram similares nas três diferentes umidades, porém, a quantidade de enzima produzida para cada umidade foi

diferente. A melhor condição de produção foi a 70% de umidade, obtendo-se dois picos principais entre 24 e 48 h (86,4 U/g) e em 120 h (88,9U/g).



**Figura 5.2.** Produção de exopectinase pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em diferentes umidades. ; -□- 60%, -○- 70%, -▲- 80%, a 45 °C em meio com 40% farelo de trigo, 40% bagaço de laranja e 20% bagaço de cana-de-açúcar.

Os resultados confirmaram que o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 é bom produtor de PG. Considerando a produção total da enzima (U/g), o maior valor foi obtido (89 U/g) ocorreu no tempo de fermentação de 120 h. No entanto, considerando-se que no tempo de fermentação de 24 horas houve um pico (86,4 U/g) com diferença não muito significativa em relação ao tempo 120 horas, optou-se por trabalhar-se com este tempo na maioria dos testes, por ser uma opção econômica na forma de aplicação industrial.

Deve-se destacar que, embora os picos de produção da enzima tenham ocorrido entre 24 e 48 horas, a 70% de umidade, assim como em meios com teores de umidades de 60% e 80% houve aumento e decréscimo da atividade enzimática do meio ao longo da fermentação. A perda de atividade pode estar relacionada a diversos fatores, a alta temperatura de incubação, a perda de água dos meios e a presença de proteases podem ter sido responsáveis pela desnaturação da proteína. Entretanto, num sistema complexo com o de FES é difícil inferir qualquer explicação para esse comportamento da enzima. Deve-se considerar também a possibilidade da síntese de isoformas da enzima, no transcurso da fermentação.

O meio utilizado proporcionou, de maneira geral, boa produção de PG pelo fungo

*Thermomucor indicae-seudaticae* N31, quando comparados com dados da literatura de produção da enzima em FES. Substratos contendo farelo de trigo, bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar tem sido usado com sucesso na obtenção de enzimas pectinolíticas microbianas. Castilho, Alves e Medronho (2000) utilizaram o fungo *A. niger* para a produção de PG com misturas de farelo de trigo e farinha de soja, obtendo produção máxima de 18 U/g. Silva e colaboradores (2005) estudaram a produção de exo-PG e endo-PG pela linhagem mesofílica *P. viridicatum* RFC3, tendo como substrato bagaço de laranja e farelo de trigo na proporção (1:1), e obtiveram o pico de produção de endo-PG entre 96 e 144 horas, com valor máximo de 5,6 U/g, e de exo-PG em 336 horas; com produção máxima de 46,4 U/g.

Zengh e Shetty (2000) fizeram estudos de produção de pectinases pela espécie *Rhizopus oryzae* NBRC4707 usando polpa de morango, de maçã e de framboesa e obtiveram 29,4 U/g, 20,1U/g e 14 U/g de atividade dessa enzima, respectivamente. Couri e colaboradores (2000) estudaram a produção de poligalacturonase por *A. niger* 3T5B8 através da fermentação de casca de banana, de manga e farelo de trigo e obtiveram atividade máxima de 30,7 U/mL. Debing e colaboradores (2006) em estudos de produção de pectinases por *A. niger* em FES contendo farelo de trigo e farelo de arroz como substratos, obtiveram 36,3 U/g.

Ustok, Tari e Gogusb (2007), fermentando substratos à base de milho com *A. Sojae* ATCC 20235 obtiveram até 30,55 U/g. Patil e Dayanand, (2006 a,b) utilizando o fungo *A. niger* DMF45 obtiveram produção máxima de 45,9 U/g de exo-pectinase utilizando como substrato resíduo de girasol. Botella e colaboradores (2007) obtiveram 38 U/g de pectinase fermentando resíduo de uva com *Aspergillus awamori*.

O bagaço de laranja tem sido indicado como indutor de pectinase por vários autores (SILVA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2007; ISMAIL, 1996), enquanto o farelo de trigo tem sido considerado um meio completo para o crescimento microbiano em baixa  $a_w$ , estabelecendo-se como meio referência para cultivos em meio sólido (COURI *et al.*, 2000, CASTILHO, ALVES e MEDRONHO, 2000; SINGH, COOPER e WHEALS, 1999).

A produção de poligalacturonase pelo fungo *T. aurantiascus* 179-5, quando cultivado em meio contendo farelo de trigo e bagaço de laranja, foi de 43 U/g entre 4 e 6 dias de cultivo (MARTINS *et al.*, 2002). Phutela, Dhuna, Sandhu (2005) reportaram a produção de poligalacturonase pelo fungo termofílico *Aspergillus fumigatus* e obtiveram atividade máxima 473 U/g, entre 48 e 72 horas de incubação.

Martin (2006) isolou 32 fungos termofílicos de compostagem de lixo urbano e pilha de bagaço de cana de açúcar. Entre as espécies identificadas encontram-se *Thermomyces sp*, *Aspergillus sp*, *Scopulariopsis sp*, *Chaetomium sp*, *Neosartorya sp*. e outras. Entre as várias



linhagens de *Aspergillus sp.* e *Thermomyces sp.* foram obtidas no máximo 76,1 U/g e 37,1 U/g de pectinase respectivamente.

Freitas e colaboradores (2006) utilizaram linhagens termofílicas de *Monascus sp.* e *Aspergillus sp.* para a produção de exopoligalacturonase em FES. Obtiveram 6,6 e 10 U/mL respectivamente.

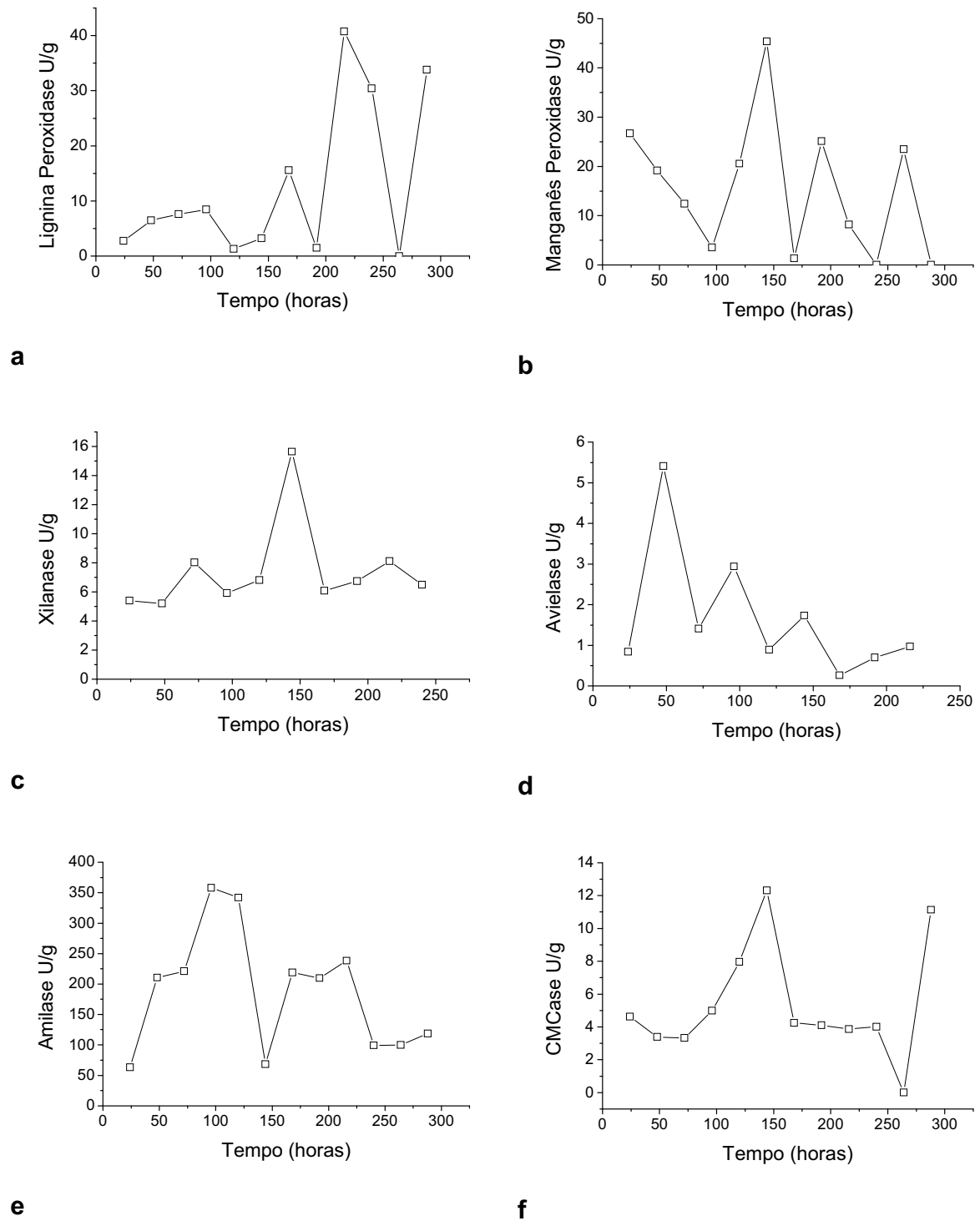
Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, há que se considerar as diferenças de metodologia de fermentação e de dosagem de atividades usadas. Pelo observado, a produção de pectinase obtida nas fermentações, apresentaram na maioria dos casos valores em U/g superiores aos encontrados na literatura, especialmente se tratando de fungo termofílico.

A presença de bagaço de cana-de-açúcar, além de ser uma possível fonte de carbono para o crescimento microbiano, visto que o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi capaz de produzir celulasas (ver perfil enzimático), pode ter contribuído para diminuir o empacotamento do meio e com isso, permitir melhor aeração e troca de calor no mesmo. A presença de fibras de bagaço de cana-de-açúcar no substrato de fermentação sólida favoreceu a produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 mesmo em ausência de celulasas (SILVA *et al.*, 2002).

Pelo observado anteriormente, o fungo estudado apresenta características muito vantajosas, em relação à rapidez de crescimento e produção da exopectinase quando comparada com os dados encontrados na literatura. Do ponto de vista industrial, a produção máxima de enzima em 24 horas de processo proporciona inúmeras vantagens, principalmente econômicas (custo de energia, processo, etc), além de reduzir a probabilidade de contaminação do processo por outros microrganismos.

#### **5.4. Estudo do perfil de produção de outras enzimas despolimerizantes**

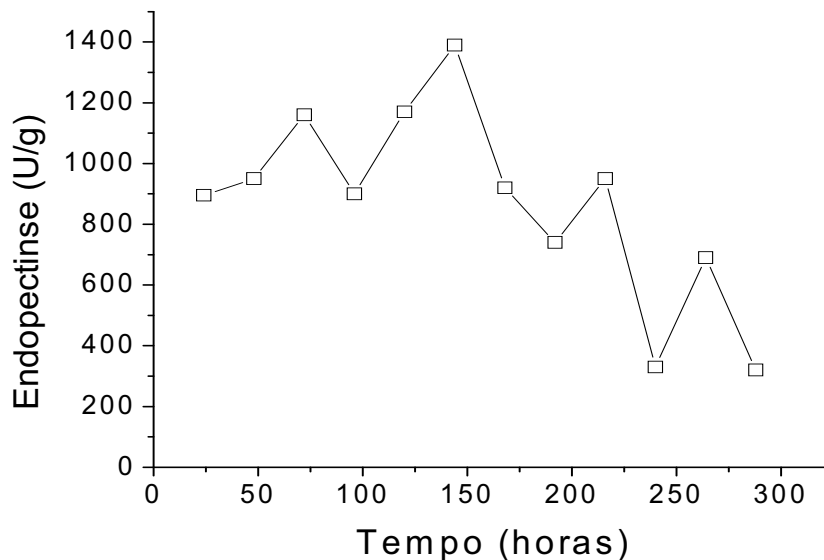
Também foram determinadas as atividades de outras enzimas despolimerizantes no extrato enzimático bruto obtido por FES durante os diferentes tempos de fermentação. As atividades enzimáticas verificadas foram manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), xilanase, CMCCase, avicelase, amilase e outra pectinase a endo-PG. Os resultados estão apresentados na Figura 5.3.



**Figura 5.3.** Perfis de produção de enzimas por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em FES, a) LiP, b) MnP, c) Xilanase, d) avicelase, e) amilase e f) CMCCase.

A produção máxima de MnP e LiP (Figuras 5.3 a e b) foi 45,4 e 40,8 U/g nos tempos de 144 e 216 horas respectivamente. A produção de xilanase (Figura 5.3 c) iniciou-se em 24 horas e se estendeu até 240 horas, com atividade máxima de 15,64 U/g, em 144 horas, enquanto a produção máxima de avicelase (Figura 5.3 d) ocorreu em 48 horas, decrescendo até 216 horas. A produção de amilase (Figura 5.3 e) foi máxima em 96 horas (358 U/g) e a produção máxima de CMCase (Figura 5.3 f) ocorreu nas 144 horas de fermentação, com a atividade máxima de 12,3 U/g.

A produção de endo-PG (Figura 5.4) apresentou 4 picos, sendo que no pico de 144 horas foi produzido 1374 U/g da enzima. Outros 2 picos apresentaram produção considerável da enzima, acima de 1000 U/g.



**Figura 5.4.** Perfil de produção de endo-PG por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em FES.

Embora com baixa atividade, a presença de endoglucanase (CMCase), xilanase e avicelase na solução enzimática bruta indica que o fungo estudado tem potencial hemicelulolítico considerável, uma vez que as atividades dessas enzimas não foram determinadas nas condições ótimas para suas atividades e portanto, os valores apresentados podem estar subestimados. O teor de amilase pode ser considerado alto, comparados com dados da literatura.

A produção de um “pool” de enzimas é necessária para o que o microrganismo possa degradar um material complexo no meio ambiente. Por outro lado, o uso de enzimas que atuam na degradação da parede celular vegetal, como celulase e xilanase, em preparado enzimático ampliam as possibilidades de aplicação industrial. A título de exemplo, celulase e xilanase, atuando sinergisticamente com exo-PG e endo-PG, aumentam o rendimento de processos de extração de sucos, além de degradarem partículas suspensas nos mesmos durante a clarificação, enquanto que a ação das amilases é importante na remoção do amido residual do suco de maçã, de banana e de pêra durante a clarificação. As preparações de enzimas comerciais usadas em processamento de suco são conhecidas por conter essas enzimas despolimerizantes (SILVA *et al.*, 2005). Na Tabela 5.1 são apresentados alguns exemplos de microrganismos, meio de cultivo e enzimas produzidas em FES.

A produção de endo e exo PG, xilanase, CMCase, avicelase e amilase pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 demonstra o alto potencial desse fungo para a produção de diversas enzimas, as quais podem ser usadas em diferentes processos industriais. Além disso, diferentes preparados enzimáticos, com grande potencial biotecnológico, podem ser obtidos.

**Tabela 5.1..** Metabólitos produzidos em FES utilizando diferentes biomateriais como substratos das FES.

<b>Autor</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Meio</b>	<b>Produção enzimática</b>
Couri <i>et al.</i> , (2000)	<i>A. niger</i> 3T5B8	Xilanase	Casca de banana, de manga e farelo de trigo	30,6 U/mL
Kalegoris <i>et al.</i> , (1999)	<i>T. Aurantiacus</i> IMI 216529	Xilanase, celulase	Farelo de trigo, suplementado com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6193 U/g
Jain (1995)	<i>Melanocarpus albomyces</i> II-68	Xilanase	Farelo de arroz	1084 U/g
Bahkali (1995)	<i>Verticillium tricorpus</i>	CMCase , avicelase		25 U/mL
Rabalho (2002)	<i>Mucor</i> sp A13-36	Amilase	Resíduo de mandioca	40,8 U/g
Botella <i>et al.</i> , (2007)	<i>A. Awamori</i>	Xilanase	Resíduos de uva	38U/g
Badhan <i>et al.</i> , (2007)	<i>Myceliophthora</i> sp. IMI 387099	Xilanase  CMCase  β- glicosidase	Palha de arroz e trigo, farelo de trigo, derivado de milho	entre 128, 9 e 900,2 U/g  entre 6,62 e 32,9 U/g  entre 2,01 e 7,48 U/g

## **5.5 Caracterização Bioquímica da exo-PG produzida em frascos erlenmeyer**

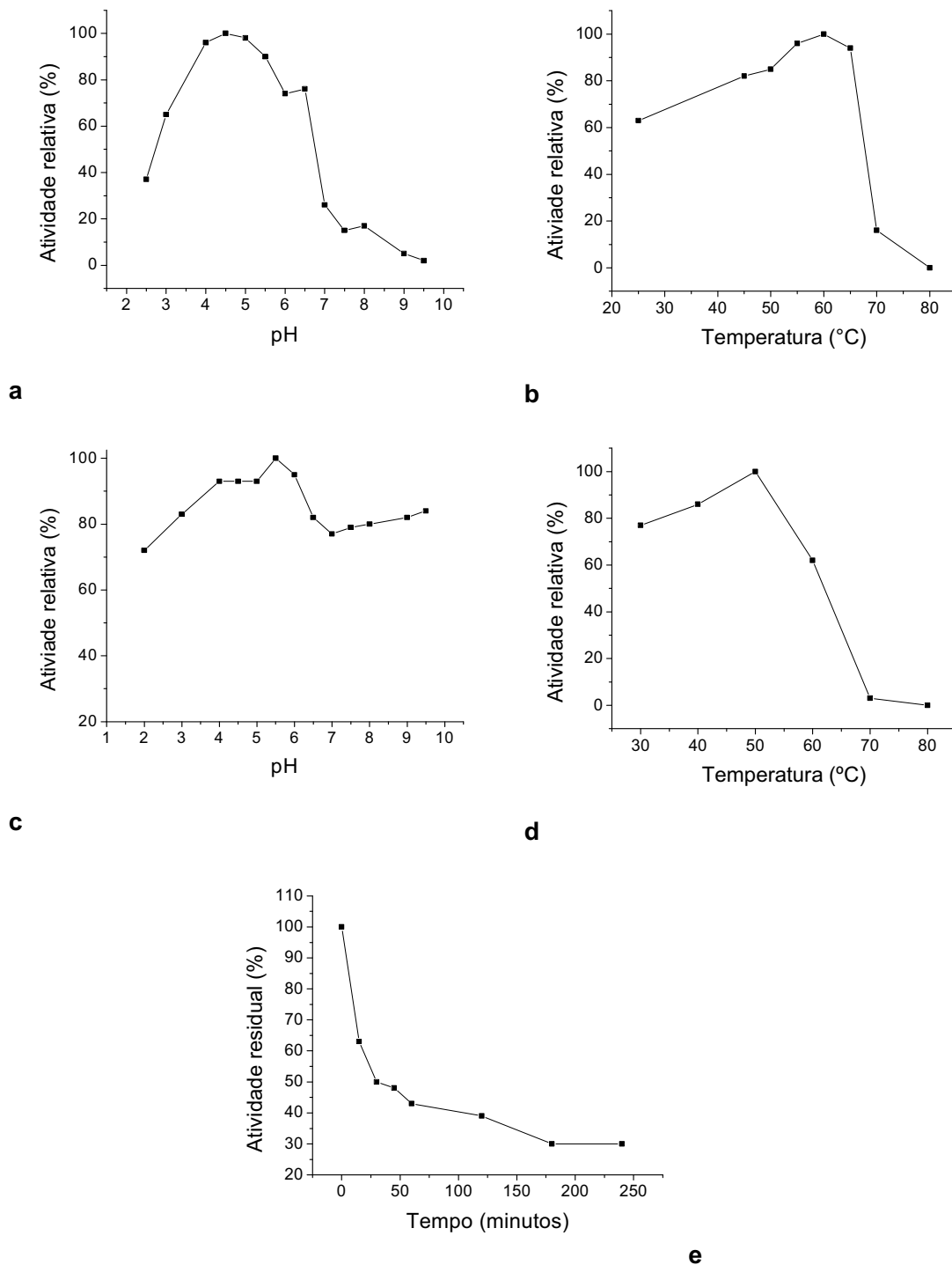
Os testes para a caracterização bioquímica da PG foram feitos utilizando-se solução enzimática bruta obtida por cultivo do fungo no meio em 24 horas de fermentação.

### **5.5.1 Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de exo-PG, e estabilidade da exo-PG frente à variação de pH e temperatura**

Com relação à influência do pH na atividade da exo-PG em diferentes tampões, nota-se que, a maior atividade ocorreu na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 (Figura 5.5 a). No caso da temperatura (Figura 5.5 b), observa-se que a enzima apresentou perfil típico de enzima termofílica, com atividade máxima a 60°C, sendo que a 25°C apresentava 60% de atividade. Em valores mais elevados de temperatura, acima de 70 °C a atividade enzimática foi reduzida para valores abaixo de 20% da atividade máxima.

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da PG, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato. A exo-PG manteve 70 % da atividade entre os pHs 3,0 a 7,5, verificando-se pico de 100 % de atividade no pH 5,5 (Figura 5.5 c).

Com relação à estabilidade térmica, em ausência de substrato, nota-se que a PG manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora entre 25 e 50°C, decrescendo para cerca de 60% na temperatura de 60°C, ocorrendo perda quase total de atividade a 70°C (Figura 5.5 d). Foi verificado que a enzima perde aproximadamente 55% da sua atividade quando incubada a 60°C por uma hora (Figura 5.5 e).



**Figura 5.5.** Caracterização físico-química da exo-PG produzida em erlenmeyer (a) Efeito do pH; b) Efeito da temperatura; c) Efeito do pH na ausência de substrato sobre a estabilidade da exo-Pg pré-incubada por 24 h; d) Efeito da temperatura na ausência de substrato sobre a estabilidade da exo-PG pré-incubada por 1 h; e) Estabilidade da Exo-PG incubada a 60°C em ausência de substrato).

Em comparação com dados da literatura, observa-se que as características físico-químicas que a enzima apresentou são similares às de outros trabalhos que empregaram fungos termofílicos. Por exemplo, Martins e colaboradores (2002) produziram poligalacturonase por *T. aurantiacus* 179-5, utilizando FES com bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como meio sólido, e observaram atividade máxima em pH 5,0 e à temperatura de 65 °C. Esta foi estável na faixa de pH ácida a neutra e a 60 °C por 1 h. Em outro trabalho Sathish-kumar e Palanivelu (1999) relataram uma poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *T. lanuginosus*, para a qual as condições ótimas de atividade foram pH 5,5 e 60 °C. A enzima manteve 100% de sua atividade original após 2 h de incubação a 65 °C e reteve 50% de sua atividade após 6 h a 50 °C. Phutela, Dhuna e Sandhu (2005) descreveram a produção de uma pectinase pelo fungo termofílico *A. fumigatus* cuja atividade máxima ocorreu a 60°C. Freitas e colaboradores (2006) verificaram que exo-poligalacturonases produzidas pelas linhagens termofílicas *Monascus* sp, com meio composto por farelo de trigo e bagaço de laranja foi mais ativa a 60 °C e a de *Aspergillus* sp, a 50 °C. A exo-PG produzida por *Monascus* sp foi estável em valores de pH entre 4,5-6,0, enquanto a de *Aspergillus* sp. foi estável somente em pH 4,0.

Outras pesquisas mostraram pequenas diferenças em relação ao pH ótimo de atividade de pectinases produzidas em FSm, como no caso de Kaur, Kumar e Satyanarayana (2004) que mostraram que a poligalacturonase termoestável produzida pelo fungo *S. thermophile* Apinis teve suas condições ótimas de atividade em pH 7,0 e 55 °C. Por outro lado a pectinase purificada produzida pelo fungo termofílico *Acrophialophora nainiana* teve atividade ótima a 60 °C e pH 8,0 e mostrou alta estabilidade a 50 °C (CELESTINO *et al.*, 2006).

Com isso, pode-se afirmar que a exo-poligalacturonase produzida neste projeto tem características físico-químicas similares às de outras encontradas na literatura, para exo-pectinase produzidas por diferentes fungos termofílicos, sendo que a faixa de pH em que apresenta melhor atividade indica para uso em derivados de frutas cítricas geralmente, de pH ácidos.

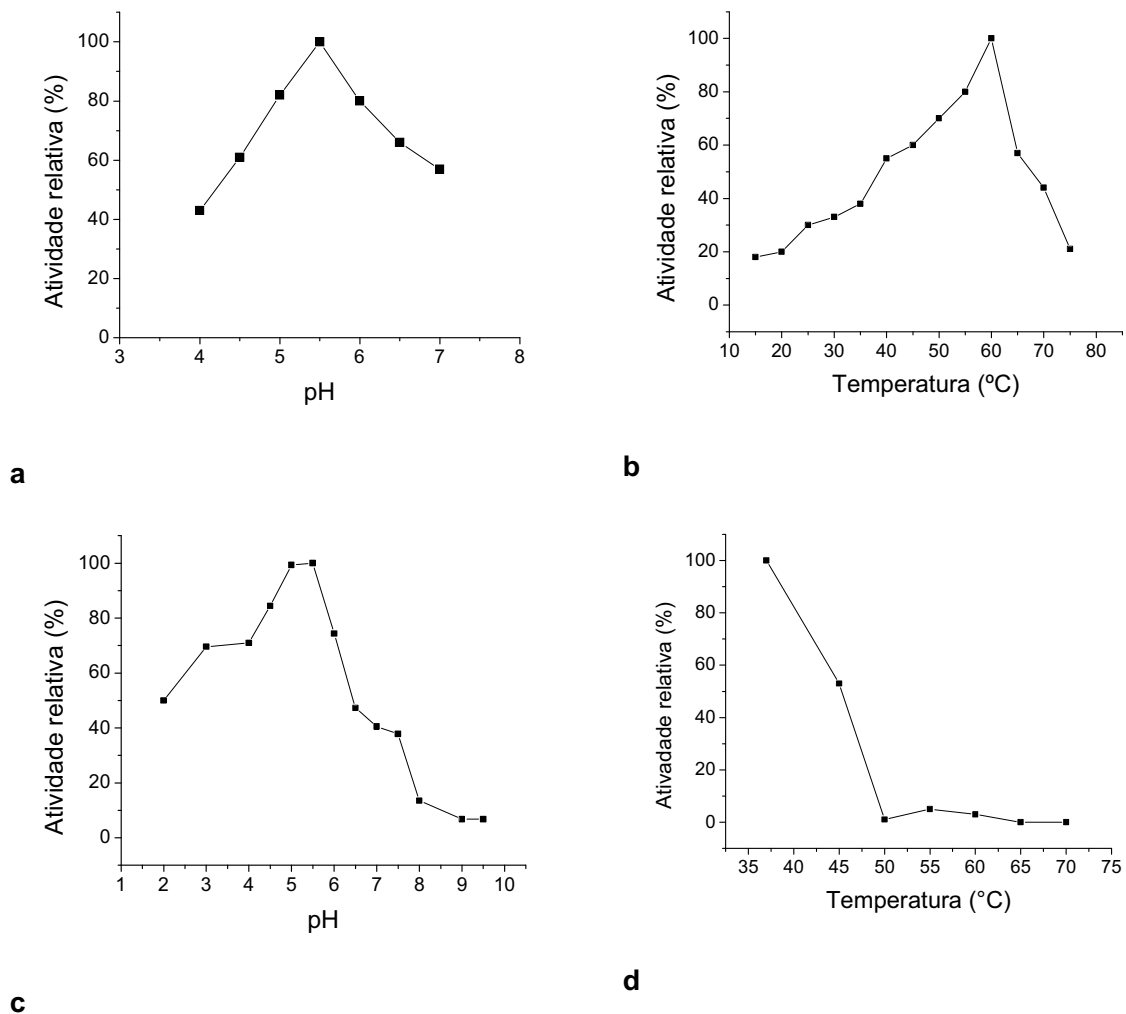
### **5.5.2. Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de endo-PG, e estabilidade da endo-PG frente à variação de pH e temperatura**

Com relação à influência do pH e temperatura na atividade ótima da endo-PG, foi



observado que as condições ótimas foram pH 5,5 e 60 °C (Figura 5.6 a, b).

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da endo-PG, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato. A endo-PG manteve sua atividade acima de 70 % entre os pH 3,0 e 6,0, verificando-se 100 % de atividade entre o pH 5,0 e 5,5 (Figura 5.6 c).



**Figura 5.6.** Caracterização físico-química da endo-PG produzida em frascos erlenmeyer. a) Efeito do pH; b) Efeito da temperatura; c) Efeito do pH na ausência de substrato sobre a estabilidade da endo-PG pré-incubada por 24 h; d) Efeito da temperatura na ausência de substrato sobre a estabilidade da endo-PG pré-incubada por 1 h.

A endo-PG quando incubada a 37°C por 1 hora em ausência de substrato manteve 100% da sua atividade, porém, quando incubada a 45°C perdeu 50% da atividade (Figura 5.6

d). Pelo observado, verifica-se que a endo-PG produzida apresentou características próprias de enzima termofílica.

Na literatura são encontrados relatos de produção de endo-PG por vários microrganismos como, leveduras, fungos e bactérias. Souza e colaboradores (2003) em screening realizado em amostras de solo e cacau isolaram 45 linhagens de fungos, dentre as quais 28 % apresentaram considerável atividade pectinolítica. O fungo *Peecilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1 foi a melhor linhagem produtora de endo-poligalacturonase, tanto em FES, como em FSm. Schwan, Cooper e Wheals (1997) verificaram que a endo-PG secretada pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 3 172 tem alta atividade na redução da viscosidade da polpa de cacau. A enzima apresentou pH ótimo entre 4,0 e 6,0, sendo que pH 5,0 geralmente é o pH ótimo de PGs produzidas por leveduras (BARNBY, MORPETH e PYLE, 1990). Estes valores são similares aos obtidos anteriormente por Luh e Phaff (1954) utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis*.

Em outro trabalho, Reyes e colaboradores (2006) observaram que a produção de endo-PG pelo fungo híbrido *Aspergillus* sp (células imobilizadas) é fortemente dependente da temperatura de fermentação (39 °C), aumentando em 10 vezes a produção da enzima quando comparada com a fermentação a 27 °C.

Outros autores purificaram a endopoligalacturonase produzida por vários fungos, dentre eles Saad e colaboradores (2007) com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894, e verificaram atividade ótima a 35 °C e pH 4.5 e que a enzima foi estável acima de 30 °C, perdendo rapidamente a atividade acima de 60 °C. Por outro lado, Gadre e colaboradores (2003), utilizando fungo psicrófilico *Mucor flavus*, verificaram que a atividade ótima da poligalacturonase foi a 45 °C e pH entre 3,5 e 5,5. Estas enzimas foram estáveis acima de 40 °C por 4 h e entre os pHs 2,5 e 6,0 por 20 h a 20 °C. A atividade decresceu rapidamente acima dos 50 °C.

Da comparação dos dados do presente trabalho com a literatura, pode-se inferir que, além das quantidades elevadas de enzimas produzidas, as suas características físico-químicas são muito positivas, revelando-as estáveis em faixas razoavelmente amplas de pH e temperatura. Como a faixa de pH ótimo encontrou-se em baixos valores de pH, prevê-se potencial de aplicação destas enzimas na indústria de processamentos de frutas.

## 5.6. Efeitos de diferentes compostos na atividade enzimática da exo-PG

O efeito de íons diversos sobre a exo-PG obtida neste trabalho, bem como de outros agentes, pode ser visto na Tabela 5.2. Nota-se que a ação de cátions bivalentes não é uniforme, havendo íons que potencializam a ação da enzima ( $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Ni^{2+}$ ), outros que inibiram fortemente a atividade enzimática ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{2+}$ ) e alguns para os quais não se observou forte interação ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ). Particularmente para os íons  $Hg^{2+}$  e  $Ag^{2+}$  a inibição da enzima foi drástica. Chen e Anderson (1979) observaram efeito similar dos íons  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^{+2}$  e  $Cu^{+2}$  na glucose isomerase produzida por *Streptomyces flavogriseus*. Desse modo, a quebra das ligações dissulfeto na molécula da enzima por metais pesados como  $Cu^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  pode inativar a mesma e/ou diminuir sua termoestabilidade (VIELLE e ZEIKUS, 2001).

**Tablela 5.2.** Efeito de cátions, detergentes, inibidores e aditivos na atividade da exo-poligalacturonase.

	Atividade relativa (%)
Controle	100
<b>Detergente (0,5 %)</b>	
Tween 20	131
Tween 80	105
Triton x-100	129
SDS	49
<b>Cátions (5mM)</b>	
$Hg^{2+}$	7
$Mg^{2+}$	216
$Mn^{2+}$	79
$Ba^{2+}$	151
$Co^{2+}$	50
$Fe^{2+}$	103
$Ag^+$	0,4
$Ca^{2+}$	143
$Cu^{2+}$	92,3
$Ni^{2+}$	117
$Zn^{2+}$	58,4
<b>5mM</b>	
EDTA	70,0
$\beta$ -mercaptoetanol	125
<b>1%</b>	
Trealose	75,4
Glicerol	50

As pontes de dissulfeto desempenham papel importante na estabilidade e desdobramento das proteínas, ou seja, têm grande influência na conformação da enzima e em sua atividade catalítica (KAUR, KUMAR e SATYANARAYANA, 2004; NELSON e COX, 2002). A glucoamilase produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* na presença de íons  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , e  $\text{Ca}^{2+}$  foi fortemente estimulada, já o efeito foi contrário na presença dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e foi inibida com  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (KUMAR e SATYANARAYANA, 2003).

Saad e colaboradores (2007) purificaram a exo-pectinase produzida pelo *Mucor rouxii* NRRL 1894 e verificaram que o íon  $\text{Mn}^{2+}$  aumentou significativamente a atividade da enzima, já os íons  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Rb}^{2+}$  não tiveram efeito considerável na atividade, no entanto, os íons  $\text{Ni}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  reduziram a atividade aproximadamente em 50%. A enzima apresentou alta sensibilidade ao  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  com 78% e 90.5% da redução da atividade, respectivamente.

Como pode ser verificada na Tabela 5.2, quando utilizados detergentes (Tween 20, Tween 80, Triton x-100), houve aumento na atividade enzimática da exo-PG, no entanto, com SDS a atividade diminuiu 51,2%. A exo-PG também foi inibida pela presença de EDTA (inibidor – ação quelante), trealose e glicerol (aditivos) e foi ativada em 25% na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (inibidor). Kumar e Satyanarayana (2003) observaram que EDTA e o  $\beta$ -mercaptoetanol tem ação inibitória na glucoamilase.

Schnitzhofer e colaboradores (2007) observaram que as PGs obtidas em FSm com *Sclerotium rolfsi* foram fortemente inibidas pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$  e o SDS e fracamente por  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , sendo que o EDTA não afetou a atividade das mesmas. Já as três formas de PGs produzidas por *A. carbonarius* foram insensíveis à presença de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , embora  $\text{Hg}^{2+}$  tenha afetado negativamente a atividade das mesmas (DEVI e RAO, 1996). Quanto ao efeito de íons na PG purificada produzida por *S. sclerotiorum*, foi verificado que 75% da atividade foi inibida pela presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , não sendo afetada pela presença de  $\text{Hg}^{2+}$  ou EDTA (MARTEL, LÉTOUBLON e FÈVRE, 1996).

De forma geral, a atividade da exo-pectinase produzida neste trabalho foi afetada negativamente por íons como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , detergente SDS, EDTA e outros aditivos. Os íons  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$  geralmente se ligam ao radical sulfidrílica da cisteína interferindo na estrutura da proteína e, consequentemente, ocasiona a perda de atividade catalítica (BRUINS, JANSSEN e BOOM, 2001). Comparando estes resultados com a literatura constatou-se que muitas pectinases sofrem efeitos por estes mesmos compostos e íons, no entanto, são afetados diferencialmente por outros compostos como no caso do  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\beta$ -mercaptoetanol. De todo modo, é difícil comparar os resultados deste trabalho com outros disponíveis na literatura, uma vez que a

estrutura das enzimas, deste e dos outros trabalhos, não é conhecida, de modo que são possíveis apenas suposições sobre os mecanismos de ação dos íons nas enzimas.

## **5.7. Análise da presença de micotoxinas**

Foi feita a verificação analítica da presença de micotoxinas no substrato fermentado por 7 dias com o *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, e com o substrato sem fermentar (controle), ambos umidificados a 70%. As micotoxinas analisadas foram a Zearalenona, Aflatoxina e Ocratoxina e as mesmas não foram detectadas no meio de fermentação. Do ponto de vista de aplicabilidade este resultado é promissor, visto que um requisito essencial para a aplicação de extrato enzimático microbiano em alimentos é que o mesmo esteja livre de micotoxinas.

## **5.8. Reator de bancada – Testes preliminares**

Nos primeiros testes feitos no reator de leito fixo surgiram os primeiros desafios a serem vencidos. Entre estes se encontravam a estabilização da temperatura do leito e evitar a condensação de água no ar que alimentara o sistema, entre outros.

Para poder ter um parâmetro de eficiência do processo fermentativo, a enzima escolhida como referência de produção enzimática nas fermentações em frascos e biorreator foi a exo-PG.

### **5.8.1. Aquecimento do ar e umidificação do ar**

As condições de fermentação utilizadas no reator foram as mesmas que as utilizadas nos ensaios em erlenmeyer (45°C e umidade inicial do substrato igual a 70%), porém, outra variável tinha que ser inserida no processo, a aeração forçada.

Um dos primeiros problemas encontrados na montagem do sistema de aquecimento e umidificação do ar foi a condensação da umidade na mangueira de transporte do ar até o fermentador, e conseqüente arraste da água condensada para dentro do reator. Outra dificuldade foi a perda de calor do ar para o ambiente, uma vez que a vazão do ar era muito baixa. Várias alternativas foram testadas e a que apresentou melhor resultado foi a de reaquecer o ar imediatamente antes da entrada do fermentador, fazendo-o passar por uma serpentina colocada em banho termostático a 45°C.

### **5.8.2. Fermentação em reator e bancada**

Nestes testes foi utilizada a mesma proporção de substratos (40% farelo de trigo, 40% bagaço de laranja e 20% de bagaço de cana) utilizada para as fermentações em erlenmayer. O processo fermentativo foi feito durante sete dias a 45 °C, 70% de umidade do substrato e 70% de umidade relativa do ar e vazão de 120 L/h.

Como já era esperado, os testes preliminares feitos no reator de bancada mostraram a ocorrência de variação de umidade ao longo do leito fermentativo (Figura 5.7). As Figuras 5.7a e b representam os quatro módulos em que se divide o reator, sendo que o primeiro módulo corresponde à entrada do ar no reator e o quarto módulo é o último, por onde o ar sai após percolar o leito fermentativo. Para a execução destes ensaios, foram feitas fermentações com 1, 2, 5 e 7 dias, sendo que em cada dia o leito foi desmontado e cada módulo dividido em três porções iguais de substrato fermentado, sendo feitas análises de umidade e atividade enzimática em cada porção.

Foi constatado que, ao longo do leito fermentativo, havia variação de umidade e conforme aumentava o tempo de fermentação essas diferenças tornam-se mais evidentes. Após as primeiras 24 horas de fermentação a umidade do primeiro módulo caiu a 50%. À medida que a fermentação transcorria, o gradiente de umidade no reator se modificava, assim, no segundo dia a umidade do primeiro módulo era de 40%, já do terceiro até o sétimo dia a umidade neste módulo ficou entre 7 e 9%. No último módulo, a umidade em todos os ensaios foi de 80-82%. Como observado na Figura 5.7, o gradiente de umidade foi crescente no sentido ascendente. Observou-se que, após 7 dias (Figura 5.7 d), os módulos 1, 3 e 4 tinham umidades estáveis, sendo o módulo 2 de transição.

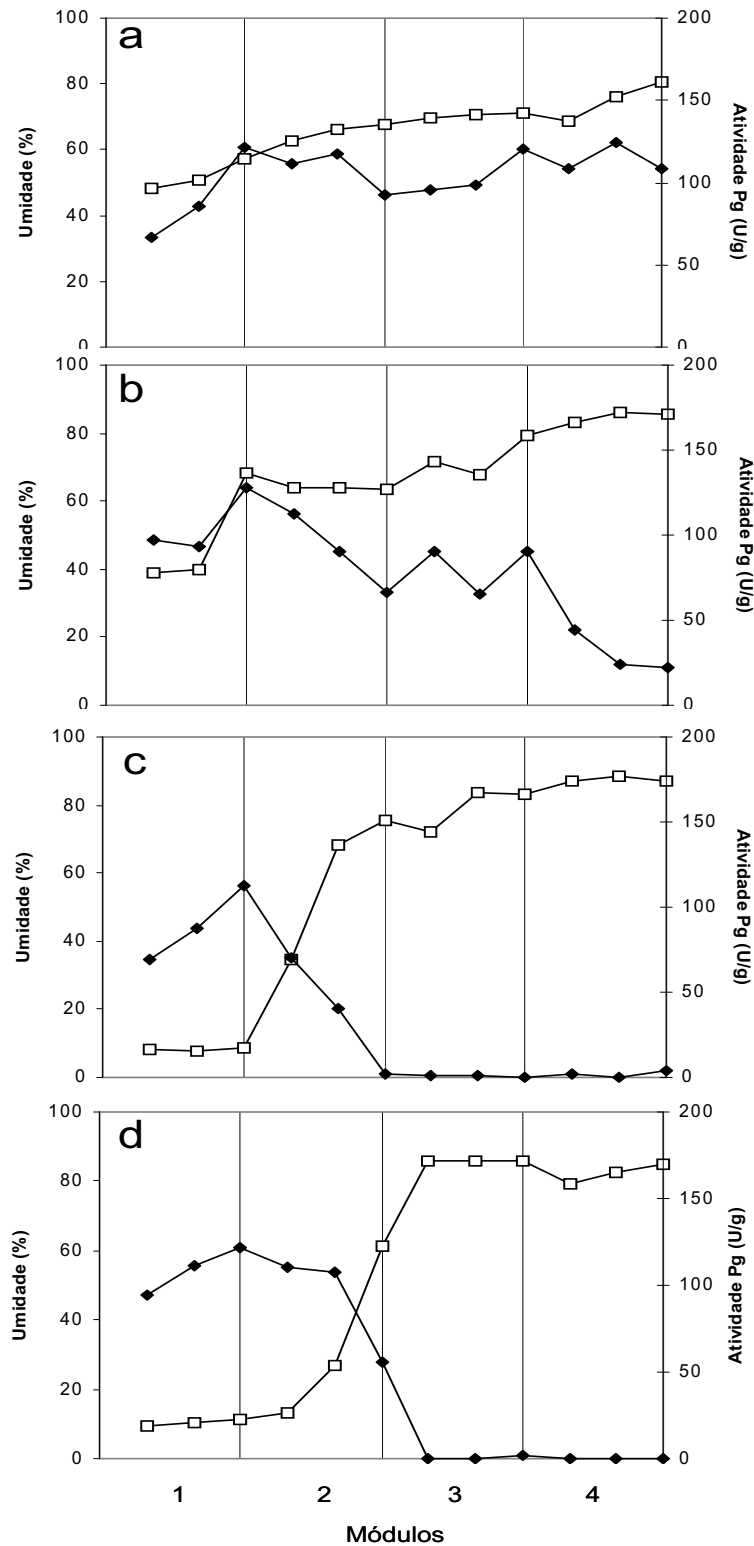
Nota-se que o substrato do módulo 1 tem aparência correspondente à de recheio solto, enquanto que o recheio dos demais módulos parecem mais densos. O que parece ter ocorrido é a condensação da umidade do ar que saia do leito e se deparar com o ambiente externo à temperatura ambiente. Ressalva-se que sobre o último módulo havia um acoplamento em aço inox, mostrado na Figura 4.2, o qual facilitava o resfriamento do ar.

Na entrada do leito, o abaixamento da temperatura se deve ao calor latente de vaporização que é removido pelo ar durante a secagem do meio poroso. Devido à baixa vazão de ar, sua saturação ocorre rapidamente e a temperatura deste passa a representar a geração de calor metabólico. De acordo com Ashley, Mitchell e Howes, (1999), a remoção do calor latente de vaporização é o método mais eficiente de resfriar o meio. No entanto, isto provoca o ressecamento do leito, o que só poderia ser contornado pela aspersão de água sobre o sólido, uma tarefa difícil em leitos fixos.

O perfil de atividade exo-PG foi melhor no tempo de 24 horas (assim como na fermentação em erlenmeyer), quando a produção foi bastante linear com relação à distribuição ao longo do leito, no entanto, no primeiro módulo a produção foi menor, uma vez que o meio fermentativo se encontrava com umidade abaixo da considerada ótima para o desenvolvimento do fungo.

A atividade enzimática durante a fermentação nos diferentes dias foi diminuindo com o aumento do tempo de fermentação. A produção média de pectinase no primeiro módulo em todos os experimentos foi de aproximadamente, 50U/g, sendo que para os demais módulos a concentração de enzima foi inicialmente maior, mas caiu sensivelmente com o avanço do processo fermentativo.

Uma possível explicação para essa queda da atividade enzimática com o tempo de fermentação pode estar relacionada à desnaturação da enzima. No módulo inferior, o fungo não se desenvolveu plenamente devido ao ressecamento do meio, mas ainda assim, produziu enzimas, ainda que com atividade menor do que a dos demais módulos com 1 dia de fermentação. Nos módulos superiores, o fungo desenvolveu-se melhor, o que possivelmente pode ter ocorrido logo nos primeiros dias de processo. Deste modo, as enzimas presentes nos módulos superiores foram produzidas nos estágios iniciais de fermentação e ficaram expostas ao ambiente por longos períodos, podendo ter sido desnaturadas.



**Figura 5.7.** Perfil enzimático e umidade na fermentação a 45 °C, 70% de umidade do meio e 70% umidade do ar de entrada (a - 1 dia, b - 2 dias, c - 5 dias e d - 7 dias de fermentação; ◆- atividade enzimática e -□- umidade).



Percebeu-se a possibilidade da enzima ter aderido à matéria sólida seca no primeiro módulo, onde as temperaturas eram inferiores, como se verá adiante, tornando o processo de troca térmica mais pobre, dificultando a desnaturação térmica da enzima, o que não dever ter ocorrido nos módulos 2, 3 e 4, nos quais as temperaturas eram mais elevadas e a atividade de água maior, favorecendo a transferência de calor.

Liu e Yang (2007) observaram na produção de celulase em FES que o aumento de umidade no substrato influencia negativamente a produção enzimática, reduzindo a área superficial entre as partículas, fazendo com que a camada de água impeça a acessibilidade do ar nas partículas do meio, assim, a água ocupa o espaço que deveria ser ocupado pelo ar. Este fenômeno acaba prejudicando a produtividade enzimática do microrganismo.

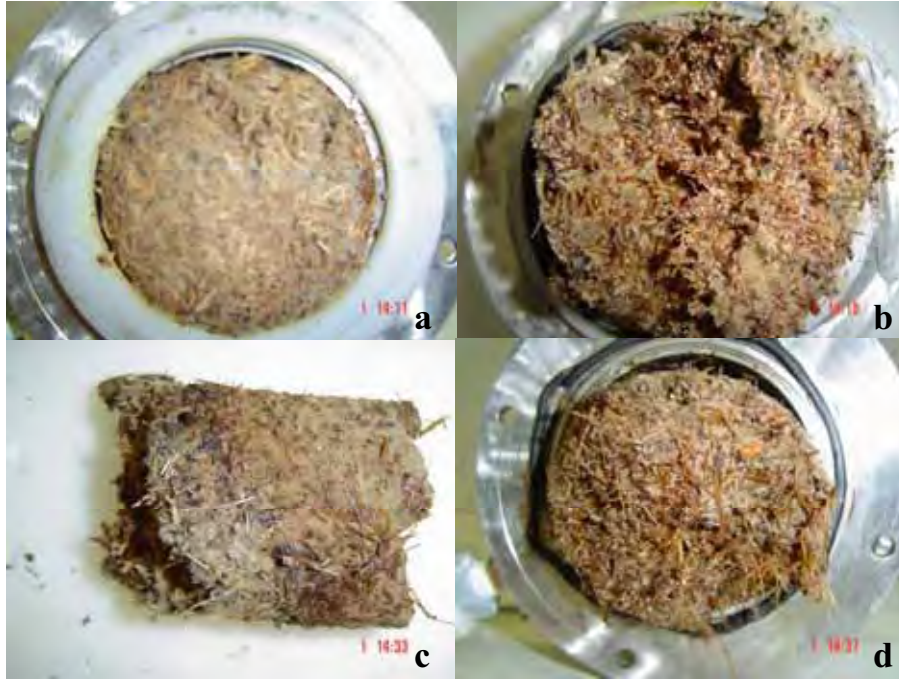
Também foi cogitada a presença de proteases no meio de fermentação, que poderia estar hidrolisando a proteína produzida. Assim, foram feitos testes para avaliar a atividade proteolítica na solução enzimática bruta obtida, e foi constatado atividades muito baixas.

Na Figura 5.8 podem ser observados diferentes cortes do substrato obtidos após a fermentação no reator de bancada. Na Figura 5.8 a (módulo 1), a umidade final após 5 dias de fermentação era de 9%, enquanto que nos outros módulos a umidade observada estava em torno de 80%.

Laurentino (2007) observou os três materiais utilizados como substratos nestas fermentações apresentam umidade de equilíbrio em base úmida diferentes. O farelo de trigo apresenta 0,35, o bagaço de cana de açúcar 0,17 e o de laranja 0,29. Com isso, os materiais absorveram o máximo de água possível, assim a água em excesso permanecia livre.

Observa-se claramente essa diferença de umidade nas Figuras 5.8 a (modulo 1) e b e d (modulo 3 e 4). Isso ocorre pois o ar não está saturado, o que faz com que o ar remova umidade do módulo inicial. Após o módulo 1, provavelmente a ar já está saturado, de modo que a umidade nos módulos posteriores ficam pouco afetadas.

O crescimento do fungo foi uniforme em todo o meio, isso se deve ao fato do *Thermomucor indicae-seudaticae* N 31 crescer rapidamente, em menos de 24 horas, neste meio de fermentação, colonizando por completo o leito fermentativo.



**Figura 5.8.** Aparência do substrato após fermentação no reator de bancada, a) primeiro módulo substrato com 9% de umidade e crescimento do *Thermomucor indicae-seudaticae* N 31 uniforme, b e d) terceiro e quarto módulo com umidade de 82% e bem colonizado pelo fungo, c) aparência do substrato após a fermentação.

Também foi analisado o perfil de temperatura do reator durante os diferentes dias de fermentação e observou-se que nos módulos 2, 3 e 4 a temperatura sempre se manteve acima da temperatura da camisa e do ar de entrada, ambos mantidos a 45 °C, concluindo-se que este aumento na temperatura do leito foi devido ao calor metabólico gerado durante a fermentação. A temperatura nestes módulos manteve-se em torno de 48 °C, não afetando assim o desenvolvimento do fungo, já que a temperatura ótima de crescimento do fungo é de 45 a 50 °C. Por outro lado, a temperatura na entrada do primeiro módulo (T1-termopar 1), que estava em contato com a parte inferior do leito e como esta perde umidade com a passagem do ar, o sensor indicava temperatura inferior a 45°C, devido ao resfriamento causado pela secagem do substrato. À medida que o meio se aproxima da umidade de equilíbrio com o ar percolante, a temperatura registrada pelo sensor tendia à temperatura de bulbo seco do ar, ou seja, 45°C, o que aconteceu após 48 horas de experimento.

Já a temperatura fornecida pelo termopar 5 (módulo 4 parte superior) manteve-se

próximo à temperatura da camisa durante os sete dias de fermentação e permaneceu inferior a T3 e a T4 nos três primeiros dias, provavelmente pelo fato do sensor T5 estar localizado entre o último módulo do reator e o acoplamento de saída, de forma que esse sofre influência da temperatura ambiente.

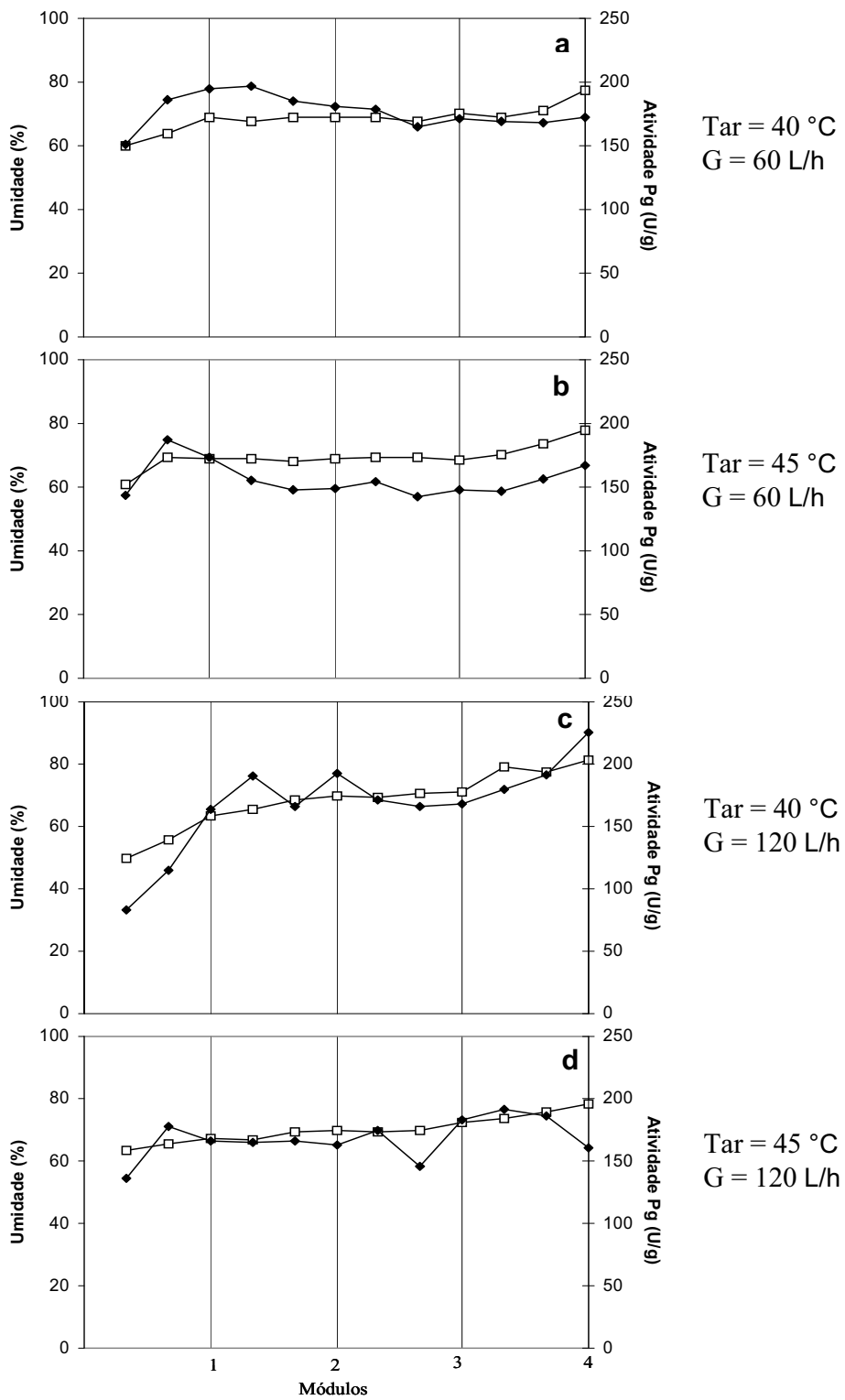
## **5.9. Ensaio com umidade relativa do ar de 95%**

### **5.9.1. Perfis enzimático e de umidade**

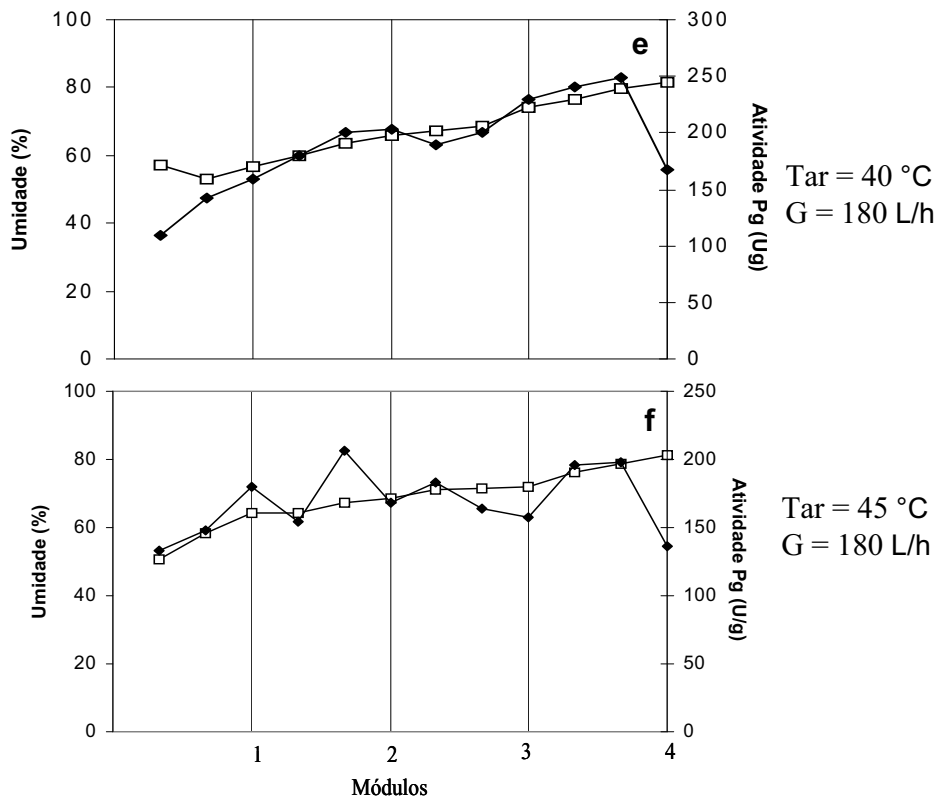
Os ensaios preliminares permitiram identificar o período ótimo de fermentação o qual foi cerca de 24 horas, além de evidenciar a formação de gradiente de umidade que afetou a produção de exopectinase. Assim, com base nestes dados, foram planejadas novas fermentações de 24 horas, nas quais foram introduzidas variáveis como temperatura do ar da entrada (40 e 45 °C), vazão da alimentação do ar (60, 120 e 180 L/h). Nestes ensaios, a umidade relativa do ar (UR) foi modificada para 95%, para tentar minimizar o fenômeno da secagem do meio.

Nas Figuras 5.9 e 5.10 pode ser observado os diferentes perfis de umidade do meio e da atividade enzimática nas diferentes condições de fermentação.

Nota-se que tanto a atividade enzimática quanto a umidade apresentaram-se mais uniformes ao longo do reator para a menor vazão de aeração. Também pode ser verificado que não havia diferença entre as médias de atividade da pectinase para as duas temperaturas de entrada do ar à vazão de 60L/h. Observa-se ainda que a produção de pectinase foi menor na região menos úmida do reator (módulo 1) para as vazões 120 e 180L/h.



**Figura 5.9.** Perfil enzimático e de umidade do meio para fermentações de 24 horas nas condições descritas (-♦- atividade enzimática e -□- umidade).



**Figura 5.10.** Perfil enzimático e de umidade do meio para fermentações nas condições descritas (-♦- atividade enzimática e -□- umidade).

Para a vazão de 60 L/h, houve ligeiro decréscimo da umidade do meio no primeiro módulo e pequena elevação no último, tanto a 40 como a 45 °C. Como o ar entrou no leito a 95% de umidade relativa, nesta baixa vazão sua capacidade de extrair umidade do meio poroso é muito limitada. Da mesma forma, ao sair do último módulo a 45 °C e atingir o acoplamento de saída para o ambiente, cuja temperatura medida pelo termopar T5 indicava sempre temperatura inferior aos outros termopares, a quantidade de água condensada também era muito pequena.

Já era esperado que o substrato secasse ao longo do tempo, havendo variação axial, porém, não se esperava o acúmulo de umidade na parte superior do leito. A Tabela 5.3 mostra que esse acúmulo no último módulo tende a aumentar com a vazão de ar.

É importante destacar o aumento na produção da enzima obtida nestas novas condições; que atingiu 250 U/g (Fig. 5.10 e).

**Tabela 5.3.** Resultados de atividade enzimática e de umidade em cada módulo do reator após 24 horas de fermentação.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/g)								
G (L/h)	T <sub>ar</sub> (°C)	Módulos					Média	Desvio-padrão
		1	2	3	4			
60	45	178,3	165,4	176,7	180,5	175,2	6,7	
	40	177,2	180,3	171,8	169,8	174,8	4,8	
120	45	167,0	207,95	183,48	207,6	191,5	20,0	
	40	120,4	182,8	168,3	197,8	167,3	33,5	
180	45	157,2	176,3	178,0	177,0	172,1	10,0	
	40	146,3	194,6	206,7	228,0	193,9	34,6	

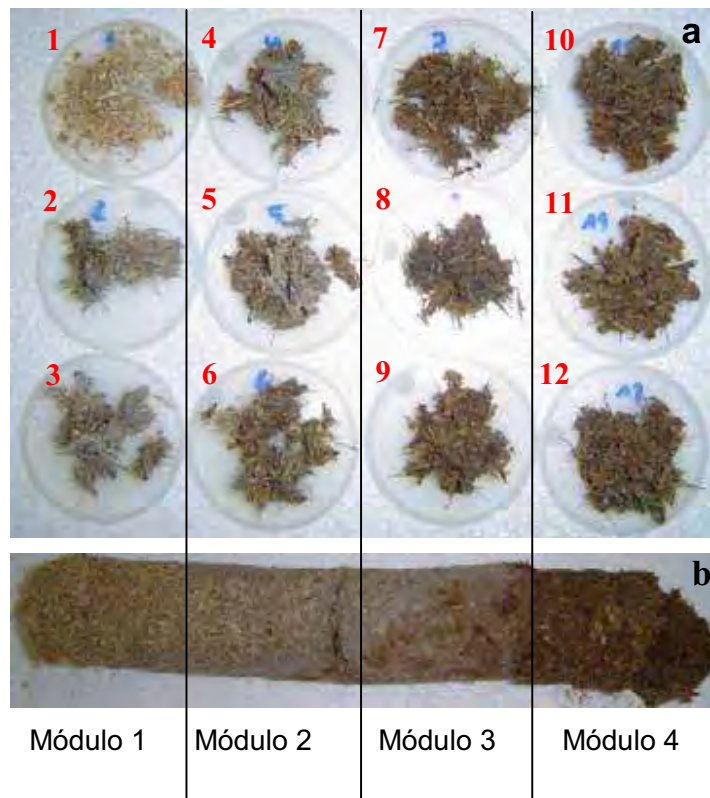
  

UMIDADE (%)								
G (L/h)	T <sub>ar</sub> (°C)	Módulos					Média	Desvio-padrão
		1	2	3	4			
60	45	66,3	68,5	69,1	73,9	69,5	3,2	
	40	64,2	68,5	69,0	72,4	68,5	3,4	
120	45	63,0	69,8	70,7	77,0	70,1	5,7	
	40	56,4	67,8	70,4	79,4	68,5	9,5	
180	45	57,7	66,3	71,6	78,7	68,6	8,9	
	40	55,7	63,2	70,0	78,7	66,9	9,8	

Na figura 5.11a, estão representadas as amostras recolhidas para a análise de umidade após 24 horas de fermentação, sendo que de cada modulo foram tiradas 3 amostras. Verifica-se claramente o perfil de umidade nas amostras, sendo que a amostra número 1 corresponde à retirada do módulo 1, onde acontece a entrada do ar. Esta amostra conseqüentemente sempre

foi a que apresentava a menor umidade, por isso apresenta cor amarelada. Já a amostra 12 foi retirada do módulo 4 e observa-se que sua coloração é mais escura, devido à alta umidade.

Na Figura 5.11b observa-se o meio fermentativo após 24 horas de fermentação. No mesmo também pode ser verificado facilmente o gradiente de umidade que ocorria durante as fermentações.



**Figura 5.11.** a) Aparência das 12 amostras (3 de cada módulo) após fermentação de 24 horas, b) aparência do leito fermentativo após 24 horas fermentação.

Os materiais celulósicos possuem elevada capacidade de retenção de água, suportando em média 70%, enquanto os amiláceos suportam até 60%, sem aparecimento de água visível. LAURENTINO (2007) observou nos testes de umidificação para o farelo de trigo, que há água líquida não retida pelo meio poroso para umidades acima de 65%. Como a condição ótima verificada nos ensaios fermentativos em escala de frascos era de 70% de umidade, esta condição também foi aplicada aos ensaios no biorreator, ou seja, um teor de água que excede a capacidade de retenção de água pelo meio poroso. Deste modo, os materiais não absorveram totalmente a água adicionada, restando uma parcela de água ligada à matriz porosa de forma

muito tênue, o que poderia propiciar arraste dessa água na forma líquida para cima, justificando o aumento da segregação de umidade com a vazão de ar.

Outro fator que pode fazer parte desse fenômeno é a degradação da fibra pelo fungo, o que poderia interferir na capacidade de retenção de água.

Para avaliar a atividade enzimática, analisou-se estatisticamente os dados, obtendo-se o resultado exposto na Tabela 5.4, onde o fator A é a vazão, o fator B é a temperatura de entrada do ar no leito e AxB é a interação dos fatores A e B. Os blocos representam os módulos do reator. A Tabela 5.4 apresenta o resultado do teste de Tukey para comparação entre as médias de produção enzimática nos módulos, uma vez que a análise de variância apontou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os mesmos. Nesta tabela, constata-se que no módulo inferior houve atividade de pectinase menor que nos demais, que, por sua vez, forneceram valores de produção semelhantes.

Apesar da Tabela 5.4 mostrar que não há diferença significativa entre os tratamentos, na Tabela 5.3 observa-se que há tendência de aumento da produção enzimática com o aumento da vazão. Porém, nota-se que para 120L/h houve produção maior quando a temperatura de entrada do ar foi de 45°C, enquanto que para 180L/h a maior produção ocorreu a 40°C.

O aumento da atividade enzimática com a vazão pode ser justificado, possivelmente, pela maior remoção de CO<sub>2</sub> do sistema, pois acredita-se que a quantidade de calor gerado no meio poroso foi semelhante para todas as condições experimentais, uma vez que as temperaturas médias no reator, bem como as temperaturas máximas, foram próximas, como mostra a Tabela 5.7. Deste modo, análises mais consistentes só poderão ser feitas com maior número de repetições que comprovem esta tendência.

**Tabela 5.4..** Análise de variância da produção de pectinase no reator

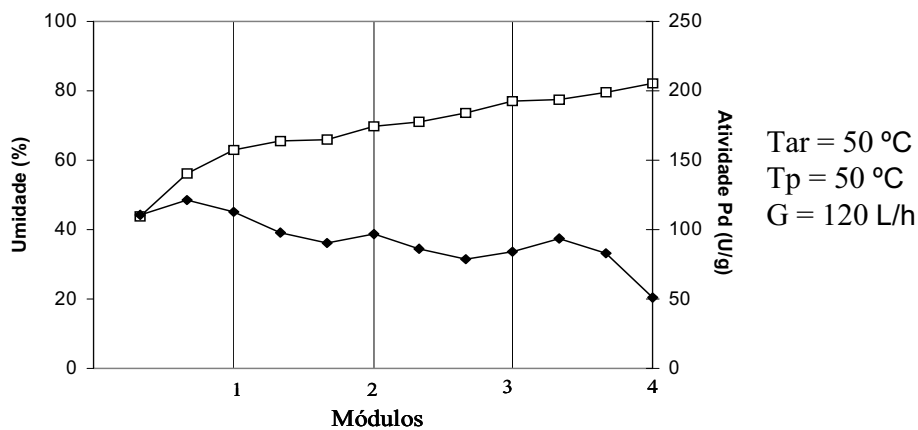
<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>(0,01)</sub></b>	<b>F<sub>(0,05)</sub></b>
Fator A (vazão)	2	256,7475	128,3738	0,4286 NS	6,36	3,68
Fator B (temperatura)	1	5,5008	5,5008	0,0184 NS	8,68	4,54
Fator AxB (Tratamentos)	2	2114,688	1057,344	3,5303 NS	6,36	3,68
Blocos (módulos)	5	2376,936	475,3873			
Resíduo	3	4172,122	1390,707	4,6433 *	5,42	3,29
	15	4492,638	299,5092			



**Tabela 5.5.** Teste de Tukey para comparação de médias de atividade enzimática por módulo do reator

<b>Módulos</b>	<b>Média</b>	<b>Comparação</b>
1	149,4	B
2	184,6	A
3	180,8	A
4	193,4	A

Na análise estatística apresentada anteriormente, só foram considerados os dados experimentais correspondentes às temperaturas do ar de 40 e 45 °C, e os resultados obtidos com relação à produtividade enzimática, temperatura e umidade foram próximos. Já no ensaio com ar a 50 °C, os valores foram muito diferentes e a influência desta temperatura foi evidente. Na Figura 5.12 podem ser verificados os perfis de umidade e enzimático na fermentação realizada mantendo-se as temperaturas do ar de entrada e da camisa a 50 °C e a vazão do ar em 120 L/h.



**Figura 5.12.** Perfil enzimático e de umidade para fermentação nas condições para Tar 120 °C, Tc 50 °C e vazão de ar 120L/h (-♦- atividade enzimática e -□- umidade).

Embora o perfil de umidade no leito tenha sido muito parecido àquele observado para a condição experimental temperatura de entrada do ar 40 °C, temperatura da camisa 45 °C e vazão 120 L/h (Figura 5.9 c e d), a produção enzimática foi significativamente inferior. Ainda que a umidade no módulo 1 tenha sido baixa, como nos ensaios anteriores, a atividade enzimática foi a mais elevada do leito. Isto parece estar relacionado com o processo de remoção de umidade do meio poroso neste módulo, o que tornou sua temperatura inferior a 50 °C (cerca de 47 °C), favorecendo o metabolismo do fungo. Nos demais módulos, a temperatura sempre foi superior a 50 °C.

Na Tabela 5.6 são comparados os resultados para as atividades de exo-PG quando os experimentos foram realizados a 40, 45 e 50 °C, temperaturas de entrada do ar e da camisa, e 95% de UR do ar.

Pela tabela 5.6 pode-se verificar que na temperatura de 45 °C foi obtida a maior produção da exopectinase, já quando a fermentação foi realizada a 50 °C a produção caiu ao redor de 50%. Com isso, adotou-se esta temperatura e a vazão de 120 L/h e UR de 0,95 para a realização dos outros testes com o biorreator.

**Tabela 5.6.** Produção da enzima em ensaios com vazão de 120L/h e UR de 0,95

	40°C	45°C	50°C
Módulo		PG (U/g)	
1	120,4	167,0	114,8
2	182,8	207,9	95,1
3	168,3	183,5	82,8
4	197,8	207,1	75,9
<b>Média</b>	<b>167,3</b>	<b>191,4</b>	<b>92,2</b>
Desvio-padrão	33,5	19,8	17,1

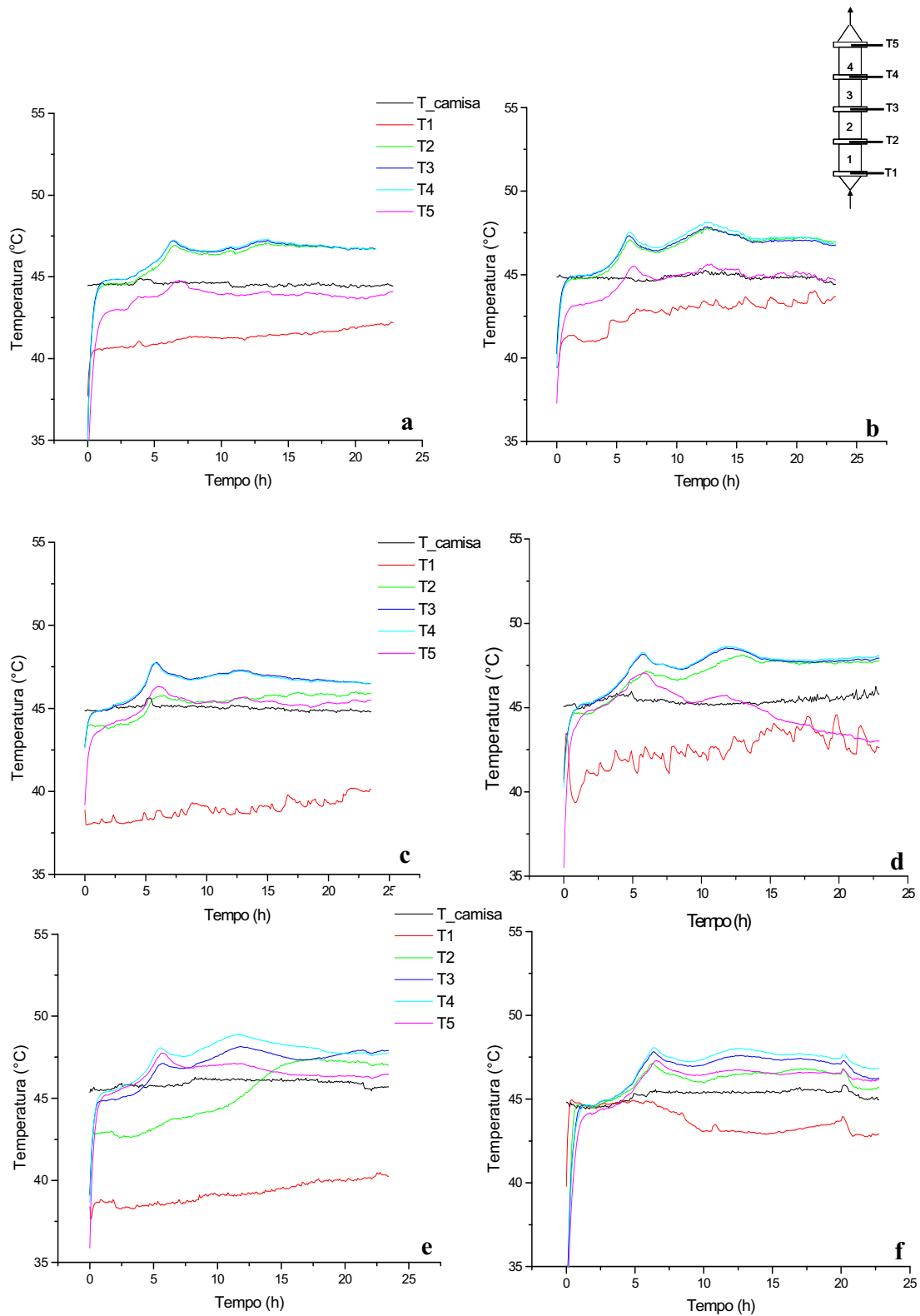
### 5.10. Perfil de temperatura das fermentações feitas em diferentes condições de processo

Existem poucas informações na literatura referente à dinâmica das fermentações em reatores utilizando microrganismos termofílicos. Fermentações em escalas maiores são principalmente relatadas para microrganismos mesofílicos, onde são utilizadas temperaturas de fermentação entre 25-32 °C (LONSANE *et al.*, 1985). A remoção do calor metabólico gerado nestes sistemas é um inconveniente bastante estudado, devido o gradiente de temperatura gerado no leito fermentativo ocasionar a inibição do crescimento do microrganismo e consequentemente baixa produtividade (GHILDYAL *et al.*, 1994).

O comportamento térmico do fermentador foi verificado medindo-se as temperaturas em várias posições longitudinais do equipamento, tendo-se como variáveis a temperatura de entrada e vazão do ar, que teve sua UR mantida a 95%.

Na Figura 5.13 são apresentados os perfis de temperatura, onde as posições correspondentes às temperaturas T1 a T5 são indicadas na própria figura. Nota-se que, qualitativamente, os perfis são similares, enquanto que os picos de temperatura foram entre 1,3 e 2,9 °C acima da temperatura média do processo. Foram registrados dois picos de temperatura sendo que o primeiro iniciou-se a partir de 3 horas de fermentação aproximadamente, estendendo-se até cerca de 8 horas. Logo após este pico, a temperatura ficou constante por período de aproximadamente 1 hora para posteriormente formar outro pico progressivamente até as 24 horas de fermentação. Cabe ressaltar que as temperaturas dos picos registrados correspondiam à media das temperaturas registradas pelos termopares 2, 3 e 4, as quais são consideradas mais representativas do processo, enquanto, as temperaturas fornecidas pelos termopares 1 e 5 sempre permaneciam abaixo das temperaturas da camisa ou do ar injetado no reator, pelas razões discutidas anteriormente.

Contudo, é difícil afirmar algo mais consistente a respeito das temperaturas, pois é preciso levar em conta que as medidas dos termopares são comprometidas, devido à inserção radial, que pode promover expansão da área de transferência de calor da camisa para o sensor, o qual atua como aleta. Tal fenômeno compromete a exatidão da medida fornecida pelo termopar, de modo que os picos de temperatura podem ter sido maiores que os obtidos nos ensaios. Posteriormente foram realizados outros ensaios para verificar a intensidade do efeito aleta, como se verá adiante.



**Figura 5.13.** Perfis térmicos nas condições Tcamisa – Tar – vazão L/h a) 45-40-60, b) 45-45-60, c) 45-40-120, d) 45-45-120, e) 45-40-180 e f) 45-45-180.

Na Tabela 5.7 pode ser observado que a maior diferença de temperatura (2,9 °C) alcançada entre o leito e a temperatura padrão da camisa foi quando utilizada as condições de fermentação correspondente à temperatura de ar de 40 °C e vazão do ar de 120 L/h, enquanto que a menor diferença (1,3 °C) foi registrada quando aplicada às condições de temperatura do ar de 45 °C e vazão de 180 L/h. Quando foi feito ensaio utilizando meio não inoculado (ensaio abiótico), a diferença da temperatura foi apenas de 0,5 °C, dentro da exatidão esperada para termopares tipo T. Em fermentações realizadas em biorreatores utilizando cepas mesofílicas a temperatura pode atingir aumento superior a 20 °C, ocasionando variações nas condições ideais do crescimento do fungo, assim como na produção de metabólitos (GHIDYAL et al., 1994), o que demonstra que a operação com fungos termofílicos tem vantagens em relação aos mesofílicos.

**Tabela 5.7.** Temperaturas máximas registradas durante as diferentes fermentações ao longo de 24 horas.

<b>Condições de processo (L/h)</b>	<b>de (Tc-Tar-G)</b>	<b>Temperatura (°C) no leito fermentativo</b>	<b>Temperatura (°C) da camisa</b>	<b>Diferença em °C</b>
45-40-60		46,9	44,9	2,0
45-45-60		46,9	44,8	2,2
40-40-120		43,2	40,3	2,9
45-45-120		46,5	44,8	1,7
45-40-180		46,7	45,2	1,5
45-45-180		46,3	45,0	1,3
Ensaio abiótico		44,7	45,2	-0,5
45-45-180				

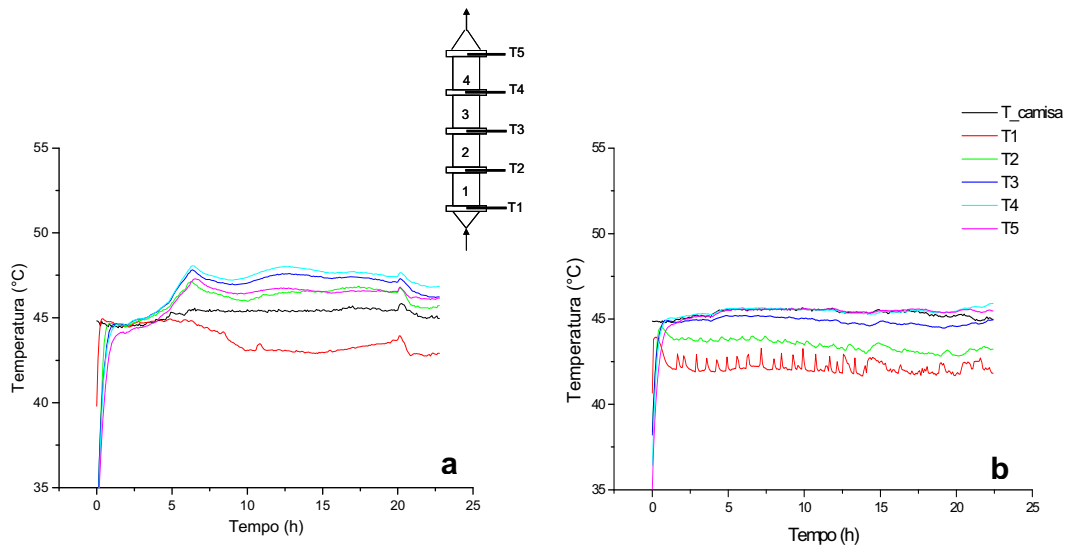
De forma a comparar o perfil de umidade e o perfil de temperatura formado durante todas as fermentações, fez-se um ensaio abiótico, aplicando-se uma das condições de fermentação utilizadas anteriormente (45 °C Tc - 45 °C Tar -180L/h).

Na Tabela 5.8 pode ser observada a distribuição da umidade do ensaio abiótico e do ensaio de fermentação. Pode ser verificado que no processo abiótico a distribuição de umidade foi mais uniforme. Tal resultado reforça a idéia de que os gradientes de temperatura devidos ao calor metabólico (Figura 5.14) favorecem a migração de umidade para o topo, mas não devem ser a única causa desse fenômeno.

**Tabela 5.8.** Umidade nos módulos do reator, para vazão de 180L/h e 95% UR (Umidade inicial do meio poroso 70%)

	Módulos			
	1	2	3	4
Processo s/ fermentação (abiótico)	58,4	64,5	70,9	74,1
Processo c/ fermentação	57,7	66,3	71,6	78,7

Com relação ao perfil de temperatura do processo sem fermentação, verificou-se que a temperatura se manteve constante (Figura.5.14 b), não ocorrendo o aumento característico da temperatura devido ao calor metabólico gerado durante o crescimento do fungo, comparado com o processo onde ocorreu a fermentação (Figura 5.14 a). Com isso, pode-se concluir que os picos de temperaturas registrados durante a fermentação correspondem às reações biológicas decorrentes do crescimento e metabolismo do fungo.



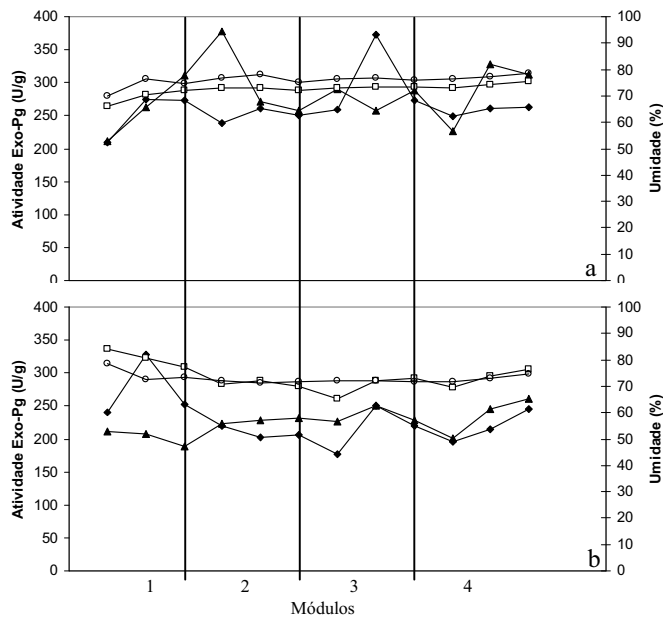
**Figura 5.14.** Perfis de temperatura no reator para  $T_{ar} = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_c = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; e  $G = 180\text{ L/h}$ ; a) fermentação, (b) ensaio abiótico.

### **5.11.. Perfil de produção enzimática e de umidade em condições modificadas do fermentador**

Com intuito de minimizar o perfil de umidade que ocorria durante a fermentação no biorreator, novas fermentações foram feitas introduzindo modificações na arquitetura do reator e na forma de aeração.

Para isso, foram adicionados dois módulos ao biorreator, totalizando seis módulos. Estes novos módulos foram posicionados um na parte inferior e outro na parte superior do reator, dentro dos quais foi colocado bagaço de cana de açúcar lavado, estéril e umidificado ( $\pm 80\%$ ). O substrato inoculado com o fungo foi colocado nos quatro módulos intermediários. O objetivo de colocar o bagaço umedecido foi de evitar a secagem do meio fermentativo, tornando mais uniformes as condições de fermentação. Após a fermentação foram colhidas amostras para avaliar a umidade do meio fermentativo nos 12 diferentes pontos de coleta de material fermentado já apresentados anteriormente. Com isso, foi verificado que a distribuição de umidade foi mais uniforme, quando comparada com os testes feitos sem os módulos adicionais. No final de cada fermentação foi verificado que no modulo inferior ocorria perda de umidade, enquanto que, no modulo superior a umidade era maior que a umidade inicial, como pode ser visto na Figura 5.16.

Na Figura 5.15 são apresentados os resultados obtidos nas fermentações feitas (1 e 2 dias) com dois tipos diferentes de aeração. A Figura 5.15a mostra o perfil de umidade e enzimático na fermentação onde a aeração foi feita pela parte inferior do reator, percolando longitudinalmente o bagaço de cana umedecido e o meio fermentativo. Com pode ser observado nesta figura, a umidade manteve-se praticamente constante. A média da umidade do reator durante um dia de fermentação foi de 72,4%, sendo que a umidade inicial do meio fermentativo foi de aproximadamente 70%. A pequena diferença de umidade registrada em todo o meio fermentativo, pode ser devido à perda de umidade do bagaço de cana no módulo inferior, e posterior condensação no meio.



**Figura 5.15.** Perfil de atividade enzimática e de umidade em fermentação em reator de bancada a 45 °C, 70% umidade e 120L/h de vazão de ar. a) Fermentação com aeração longitudinal 1 e 2 dias, b) Fermentação com aeração radial, 1 e 2 dias. ♦ atividade 1 dia fermentação, ▲ atividade 2 dias fermentação, □ umidade 1 dia fermentação, ○ umidade 2 dias fermentação.

A mesma situação foi observada quando a fermentação se estendeu por 48 horas. Foi observada oscilação na atividade nesse período, porém, a média verificada foi de 266 U/g e 283 U/g de exo-PG para um e dois dias de fermentação, respectivamente.

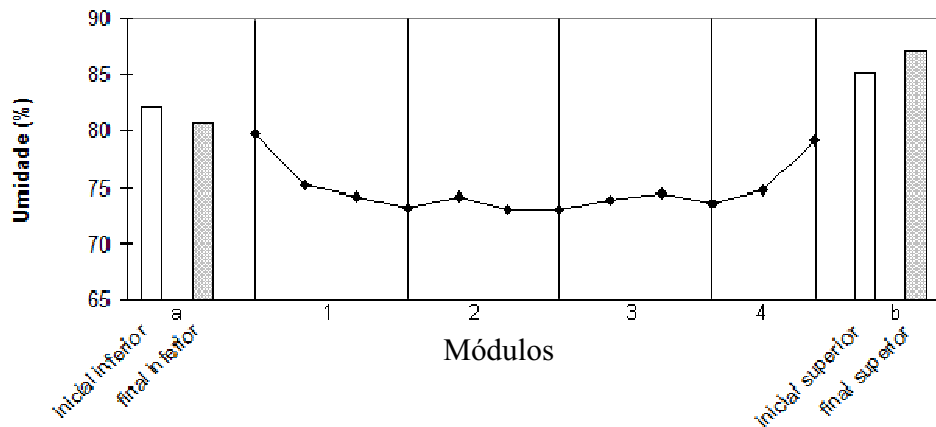
Quando feitos os ensaios com a aeração radial (Figura 5.15 b) a umidade também foi estável, porém a variação entre um dia e dois de fermentação foi menor (73,7 e 73 % respectivamente). Com relação à atividade da exo-PG, houve menor produção (230 e 226 U/g respectivamente), quando comparada com os ensaios com aeração longitudinal, embora número maior de ensaios deva ser feito com ambas as configurações para que se possa fazer comparação com validade estatística.

Como não houve controle estrito sobre a vazão de ar que passa através dos orifícios do tubo central, algumas regiões podem ter sido contempladas com maior quantidade de ar do que outras, ocasionando variação da atividade enzimática em decorrência de crescimento heterogêneo do fungo, embora, visualmente, não tenha sido observada diferença expressiva no micélio que recobria o meio poroso após a fermentação.



De forma a visualizar melhor o fenômeno ocorrido com a umidade dentro do reator durante a fermentação, na Figura 5.16, é evidenciada a migração de umidade. Nesta Figura as barras representam a umidade inicial (tempo 0 horas) e final (tempo 24 horas) do bagaço de cana no módulo inferior e superior respectivamente. O bagaço de cana foi mergulhado em água destilada estéril por aproximadamente 30 minutos e posteriormente a água em excesso foi retirada. A umidade do bagaço era de 83-85%. Os pontos da figura representam a umidade das amostras nos quatro módulos.

A umidade inicial do meio fermentativo foi de aproximadamente 70% e como pode ser verificado na Figura 5.16 no módulo inferior houve perda de umidade (82% para 80%), já no módulo superior houve ganho de umidade do bagaço de cana (85% para 87%).



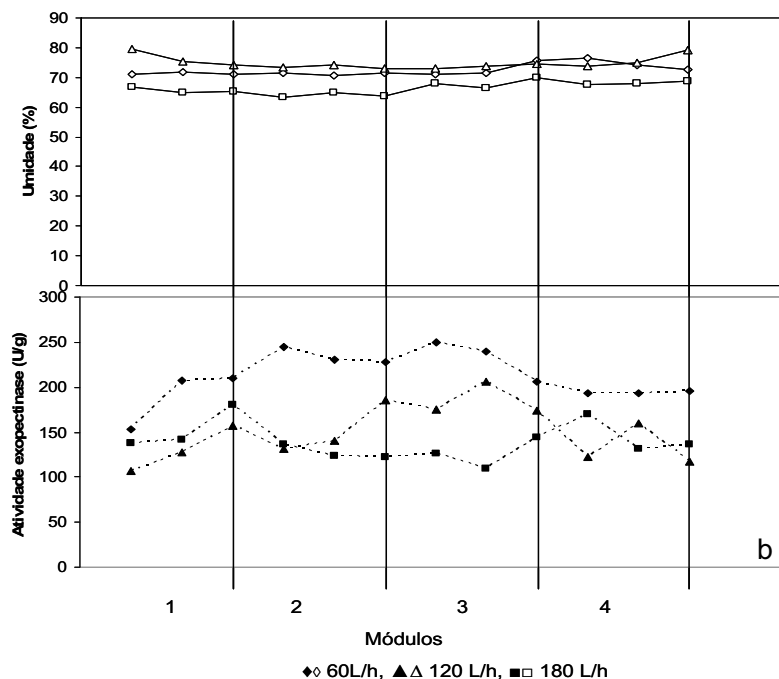
**Figura 5.16.** Perfil de umidade da fermentação de reator em bancada nas condições de 45 °C, 70% umidade e vazão de 120L/h. □ umidade inicial cana, ■ umidade final cana e ♦ umidade meio fermentativo nos diferentes módulos.

Verificando-se os pontos de umidade do leito fermentativo, pode ser observado que a amostra subsequente ao do módulo inferior ganhou umidade, isto como consequência da perda de umidade do bagaço de cana presente no módulo inferior. No restante do leito fermentativo a umidade manteve-se uniforme ( $\pm 73\%$ ) e no ponto superior do reator também houve ganho de umidade, tanto no meio fermentativo (75% para 80%) como no bagaço de cana.

A aeração tem papel fundamental durante fermentação em estado sólido, principalmente quando se trata da remoção de calor e  $\text{CO}_2$  gerado durante a fermentação. Por isso, para o bom entendimento de processo fermentativo é de fundamental importância o conhecimento, das

condições ótimas do processo. Com o intuito de verificar qual a melhor vazão de ar para a fermentação no reator de bancada com aeração longitudinal, foram testadas três vazões (60, 120 e 180 L/h), avaliando-se a produção de exo-PG nessas condições.

Na Figura 5.17 a. pode ser verificado o perfil de umidade nas três vazões, sendo que na maior vazão (180 L/h) foi registrada a menor umidade do meio (média 67%), já nas vazões de 60 e 120 L/h, as umidades foram praticamente iguais (média 73 e 75%, respectivamente).



**Figura 5.17.** Perfil de umidade (a) e de atividade enzimática (b) durante fermentação em reator de bancada nas condições de 45 °C, 70% umidade.

Analisando-se o perfil de produção da enzima nas três diferentes vazões de ar (Figura 5.17b), pode ser observado que na vazão de 60 L/h houve maior produção da PG (média= 200,7U/g), sendo que nas vazões de 120 e 180 L/h foi em média de 147,9 e 141,5 U/g respectivamente. Esse resultado é inesperado, pois acreditava-se que a produção de enzimas seria próxima para as 3 vazões, uma vez que a distribuição de umidade no leito foi muito uniforme em todos os experimentos e teve valores médios não muito distintos. Assim, o fator umidade deixaria de influenciar o crescimento do fungo e a produção enzimática.

Outro fator que poderia influenciar o processo metabólico seria a disponibilidade de oxigênio e remoção do gás carbônico, mas esta situação seria favorecida pela maior vazão e não pela menor, como de fato ocorre. Assim, novos experimentos devem ser realizados para confirmar esta tendência.

Kalogeris et al. (1999) verificaram que a produção enzimática (endoglucanase, xilanase entre outras), utilizando o fungo *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo foi bem uniforme em todo o leito fermentativo, já que o reator foi dividido em três partes iguais, obtendo-se amostras do três terços do reator (entrada do ar, meio, saída do ar). As amostras foram coletadas após 190 horas de fermentação. A umidade em todo o meio de fermentação também manteve-se uniformemente distribuída, sendo que a umidade inicial era de 75% e na entrada 73,2%, acontecendo sim secagem mas não muito significativa.

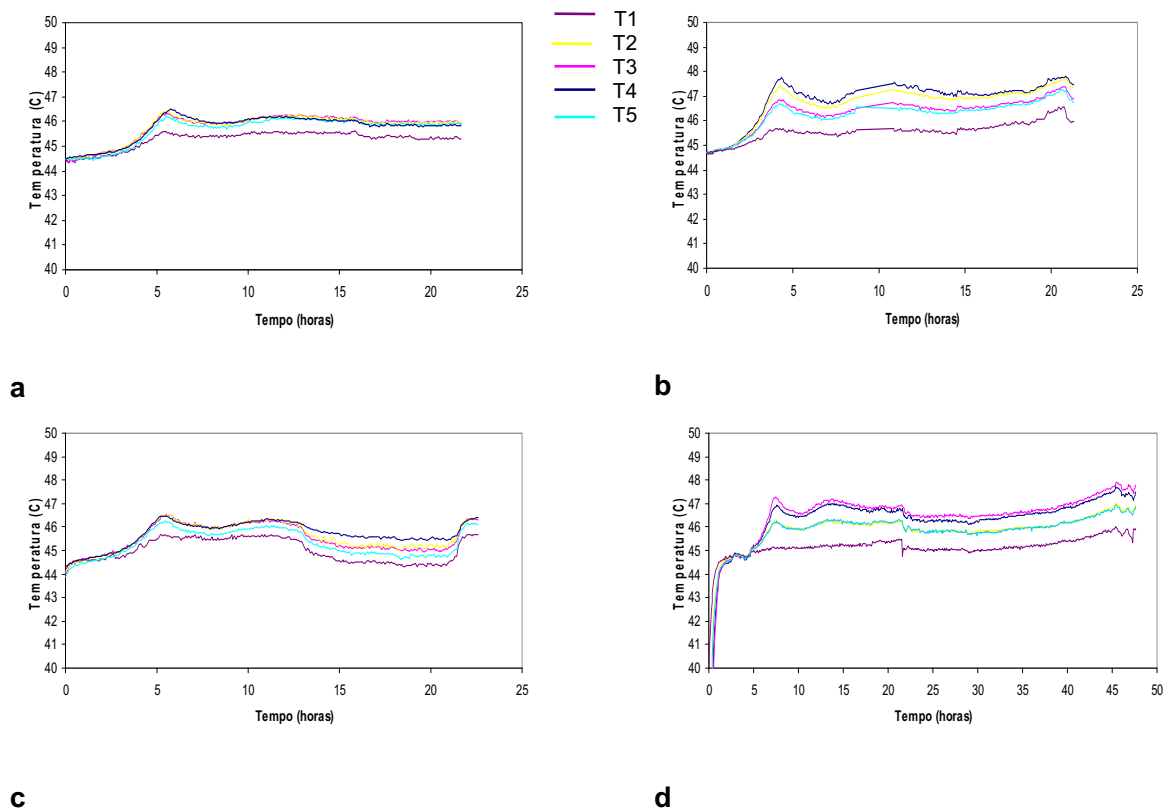
Kalogeris et al. (2003) fizeram testes com o fungo *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo utilizando um biorreator operando a 49 °C com agitação intermitente. Foram aplicadas umidades relativas de 66, 75 e 80% e constataram que no final da fermentação a perda de umidade foi de 1,6, 0 e 3,2% de umidade respectivamente. Outra variável empregada neste trabalho foram as temperaturas de fermentação (45, 49 e 53 °C). O reflexo destas temperaturas na umidade do leito fermentativo foi a perda de 3,7, 3,9 e 6,4% da umidade do meio fermentativo (condições de operação: umidade inicial do meio 80%, vazão do ar 10L/min/g). Os pesquisadores observaram que quando utilizada vazão de ar de 1 e 2 L/min/Kg<sub>ms</sub> o leito fermentativo ganhou 2,1 e 1,5 % de água, no entanto, quando a vazão foi aumentada para 5, 10 e 15 L/min/Kg<sub>ms</sub> houve perda de umidade de 2,6, 3,9 e 2,7 % respectivamente.

Contudo, foi observado que altas umidades favoreceram a produção de celulasas e hemicelulasas. Dependendo da enzima, a produção foi melhor com umidade de 75% ou 80%, valores estes normalmente aplicados para FES. Estes resultados eram similares aos obtidos por Jecu (2000).

Nos primeiros ensaios, os termopares foram colocados no sistema de fermentação perpendicularmente ao meio fermentativo, ou seja, radialmente. Analisando-se o perfil de temperatura obtido, foi observado padrão térmico muito parecido nas diferentes condições de fermentação. Este padrão homogêneo gerou algumas dúvidas em relação à confiabilidade destes dados devido à inserção radial dos termopares, devido ao efeito aleta (THOMEIO e GRACE, 2004). Este fenômeno compromete a exatidão da medida fornecida pelo termopar, de modo que os picos de temperatura poderiam ter sido maiores que os adquiridos nos ensaios.

Para avaliar a influência da forma de inserção dos termopares sobre as medidas de temperatura, foi testada a inserção longitudinal dos termopares como descrito no item 4.3 do capítulo Materiais e Métodos.

Os resultados comparativos das medidas de temperatura com os termopares inseridos radial e longitudinalmente, mantendo-se em ambos os experimentos a alimentação longitudinal de ar, pode ser visto nas Figura 5.18. Na Figura 5.18b, a posição da extremidade dos termopares era de 20 cm a partir do topo do fermentador e nas posições radiais distanciadas 1,1 cm partir do centro.



**Figura 5.18.** Perfil de temperatura da FES em biorreator de bancada; a) aeração ascendente e termopares dispostos de forma radial; b). aeração ascendente e termopares dispostos de forma axial (20 cm de altura); c).aeração centralizada e termopares dispostos radialmente; d) aeração centralizada e termopares dispostos radialmente (48 horas); T= termopar.

Observa-se apenas ligeira elevação das temperaturas registradas pelos termopares longitudinais, cerca de 1 °C acima daquelas obtidas com os termopares radiais, evidenciando-se efeito aleta, que dada a intensidade das variações de temperatura ao longo dos ensaios, entre 2,5 e 3,5 °C, pode ser considerado significativo. No entanto, não foi observada alteração qualitativa do perfil de temperatura. Assim, considerando-se que na faixa de operação adotada o fungo tem bom crescimento, ou seja, que o fungo pode se desenvolver satisfatoriamente até 50 °C, e devido à facilidade operacional, nos demais testes realizados os termopares foram inseridos radialmente.

De forma a verificar se as características da fermentação se mantinham após 24 horas de experimento, foi feito um ensaio de fermentação por 48 horas, nas novas configurações do equipamento onde foram verificados os perfis enzimático, de umidade e térmico (Figura 5.18c e 5.18d). O perfil de temperatura manteve-se inalterado enquanto que os perfis enzimáticos e de umidade serão discutido posteriormente.

No caso da fermentação com aeração radial (Figura 5.18c), a diferença registrada entre os cinco termopares é menor que no caso da alimentação longitudinal o que é um resultado coerente, uma vez que o ar que penetrava no leito estava sempre a 45 °C quando saía do tubo central, independente da posição longitudinal por onde se dava esta saída. No entanto, esta maior uniformidade térmica não se traduziu em homogeneidade da atividade enzimática.

Por exemplo, Gutiérrez-Rojas *et al.* (1996) verificaram que o gradiente de temperatura dentro de fermentador em condições estáticas pode alcançar 3,1 °C cm<sup>-1</sup>, podendo alcançar temperaturas de até 48 °C dentro do leito.

Em outro estudo Rizzato (2004), fermentando com fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 em reator em coluna com diferentes densidades aparentes do meio fermentativo, observou que quanto maior a densidade aparente maior o aumento de temperatura no leito fermentativo. A autora utilizou um sistema que operava a 28 °C, porém no transcorrer da fermentação a temperatura máxima observada foi de 36,2°C. Esta temperatura foi registrada na altura média do reator, sendo que as temperaturas sempre foram menores na base e topo do reator. A autora observou também que a maior produção de exopectinase ocorreu no meio de menor densidade aparente. Por outro lado, Chen, Xu e Li (2005) fizeram FES com *Penicillium decumbens* JUA10 em biorator operando a 27±1 °C, com ar a 90–97% de umidade relativa e aplicaram várias estratégias para dissipar o calor metabólico gerado. Verificaram que quando o reator operava em regime estático a temperatura do leito alcançava 53 °C, porém, introduzindo ar de formas e vazões diferentes, o acúmulo de calor foi reduzido consideravelmente. Nas condições ótimas de processo o gradiente máximo de temperatura foi de 0,12 °Ccm<sup>-1</sup>.

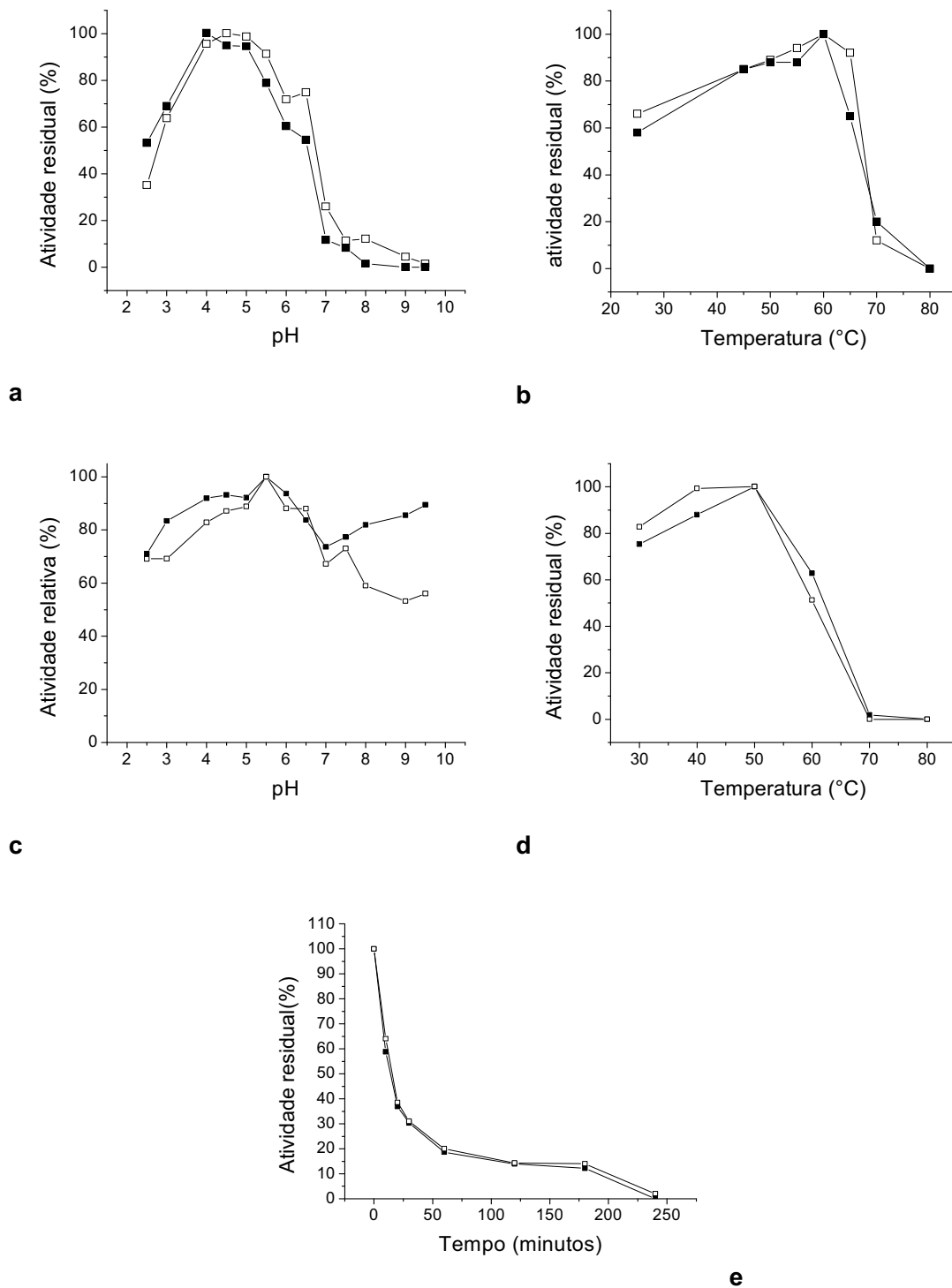
Stuart *et al.* (1999) fizeram FES em um reator de coluna e observaram que o aumento de temperatura ao longo da fermentação foi entre 33,4°C e 35,5°C. Em outro estudo, Gowthaman *et al.* (1993) também com reator de coluna observaram temperaturas entre 45°C e 47°C, respectivamente.

Recentemente, Fanaei e Vaziri (2009) fizeram a comparação dos dados obtidos experimentalmente por Ghildyal *et al.* (1994) em FES com *Aspergillus niger* em farelo de trigo com a modelagem do sistema. Verificaram que houve similaridade entre os dados do modelo matemático e experimental no que respeita ao perfil de temperatura do reator.

Comparando os dados obtidos neste trabalho e com a literatura, foram observados dados similares com os das fermentações realizadas com cepa termofílica *Thermoascus aurantiacus* (KALOGERIS *et al.* 1999), onde foi verificada a uniformidade na distribuição da temperatura no leito de fermentação. Posteriormente em outro trabalho, Kalogeris e colaboradores (2003) fizeram fermentações em biorreator com agitação intermitente utilizando a mesma cepa fúngica, sendo o processo de fermentação realizado nas temperaturas de 45, 49 e 53 °C. Foi verificado que a variação da temperatura do leito foi  $44,3 \pm 1,1$ ;  $48,4 \pm 0,9$  e  $52,2 \pm 1,3$  °C respectivamente, variação considerada desprezível, demonstrando que a elevação da temperatura devido à geração de calor metabólico quando se utilizaram cepas termofílicas é muito inferior do que quando se empregam fungos mesofílicos.

### **5.12. Comparação das características físico-químicas da exo-PG produzida no reator e em frascos.**

Na Figura 5.19 observa-se a caracterização físico-química da exo-PG produzida no reator de bancada e em frasco. Observa-se que a enzima apresenta as mesmas características quanto a temperatura e pH ótimos e estabilidade, assim como à estabilidade a 60 °C. Com isso pode se concluir que a dinâmica da produção em biorreator não acarretou em nenhuma mudança no tipo de enzima secretada.



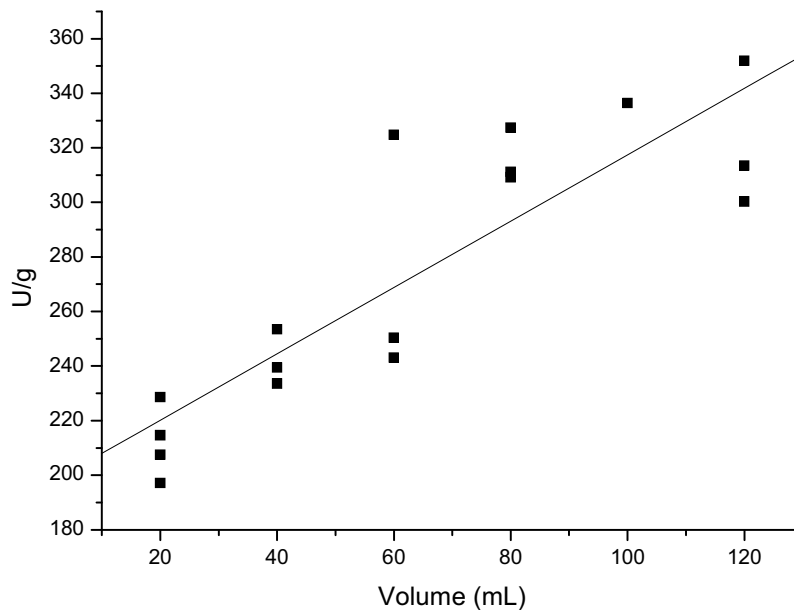
**Figura 5.19.** Características físico químicas da exopectinase produzida em reator de bancada (■) e em frascos (□). a) Efeito do pH sobre a atividade da exo-PG; b) Efeito da temperatura sobre a atividade da exo-PG; c) Efeito do pH na ausência de substrato sobre a estabilidade da exo-PG; d) Efeito da temperatura na ausência de substrato sobre a estabilidade da exo-PG; e) Estabilidade da Exo-PG incubada a 60°C em ausência de substrato.

Um dos objetivos principais deste trabalho foi a comparação da produtividade entre a escala de frascos e do reator de bancada. Na Tabela 5.9 pode ser observada a diferença em termos de atividade enzimática entre as fermentações realizadas em frascos erlenmeyer e no biorreator de bancada.

Para os cálculos das unidades de enzimas produzidas em frasco foi considerado o volume de água que foi adicionado ao meio para fazer a extração (40 mL água para cada 5 gramas de substrato). Já para os cálculos da atividade enzimática produzida no fermentador de bancada foi levado em conta, além do volume de água utilizado (20 mL), a massa de água correspondente à umidade do substrato. Esta estratégia foi adotada por ter sido observado o perfil de umidade, como mostrado anteriormente. Assim, para se ter valor de atividade enzimática que fosse válido para todo o substrato distribuído no reator, foi imprescindível levar em consideração a umidade do mesmo para a dosagem enzimática. Cabe ressaltar que ambas fermentações correspondem ao período de 24 horas de processo fermentativo, levando em consideração que a exo-pectinase foi o alvo deste estudo, e que a produção máxima da mesma acontece neste tempo.

Para poder fazer esta comparação, primeiramente foram corrigidos os valores calculados para a atividade enzimática obtida nas condições de fermentação em frascos. Para isso, foi feita curva de calibração (Figura 5.20) entre a produção da exo-PG em frascos e reator. A extração da enzima em frasco foi feita com diferentes volumes de extração (20, 40, 60, 80, 100, 120 mL).





**Figura 5.20.** Curva de calibração da produção enzimática em frascos erlenmeyer em função ao volume de extração.

Esta iniciativa foi tomada, pois os resultados obtidos para os ensaios em frascos e em reator foram muito distintos. Suspeitou-se que a quantidade de água empregada para extrair as enzimas do meio poroso fosse uma variável a se observada. De fato, como pode ser notado na Figura 27, o volume de extração tem relação direta, linear crescente, com a atividade enzimática. Infelizmente, não existe metodologia oficial estabelecida para este tipo de processo, o que torna a comparação dos resultados obtidos por diferentes autores de pouca validade e por isso requer novos estudos.

A equação de regressão da curva apresentada na Figura 5.20 é:

$$U = 195,82 + 1,22 V$$

Onde, U é U/g e V é volume de extração;

O coeficiente de regressão foi igual a 0,86087, um valor satisfatório em se considerando um processo biológico.

**Tabela 5.9.** Comparação da produção de exopoligalacturorase em FES em frasco e reator de bancada.

		Tempo de fermentação (h)	U/g <sub>ms</sub>
Erlenmeyer	Condição ótima*	24	301,3 ± 12,1
Reator configuração 1 (4 módulos)	Condição ótima**	24	191,4 ± 19,8
Reator configuração 2 (6 módulos)	Aeração longitudinal**	24	266,0 ± 38,5
		48	283,0 ± 45,6
	Aeração radial**	24	230,0 ± 38,7
		48	226,0 ± 21,1

\* fermentação a 45 °C e umidade do meio 70%

\*\* condições de processo fermentação a 45 °C, umidade do meio 70%, umidade relativa do ar 95% e vazão do ar 120 L/h.

Quando utilizados sistemas de aeração diferentes foi verificado que com aeração longitudinal a produção da enzima foi maior que com aeração radial (Tabela 5.9). No teste feito fermentando por 48 horas, quando utilizada a fermentação longitudinal a produção foi maior, no entanto, o desvio padrão em todos os casos foi alto, o que dificulta afirmar exatamente qual o melhor tempo de processo. Nos ensaios em erlenmeyer também foi observada esta diferença, uma vez que no tempo de 48 horas a produção de exo-PG foi levemente superior que no tempo 24 horas.

Kalogeris et al. (2003) fizeram a comparação da produção enzimática em reatores de frasco (erlenmeyer) e o biorreator de tambor rotativo e observaram que para a maioria das enzimas analisadas (celulase, celobiose, β-glicosidase, FPA, β-xilosidase), a produção no biorreator foi maior (44,0, 23,0, 19,5, 128,0 e 38,7% respectivamente, já na produção de xilanase, esta foi maior na escala de frascos (17,8%). Os mesmos autores fazem a comparação de produção enzimática deste biorreator com outros, mas a ressalva foi que os outros biorreatores operavam na faixa de crescimento mesofílica, e este fato vem a confirmar a falta de informações na literatura relativos de processos de fermentação com microrganismos termofílicos em escala de reator.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir, de maneira geral, que a obtenção de pectinase através do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, tendo bagaço de laranja, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar como substrato em FES, foi satisfatória, tanto na escala de frasco como na de reator de bancada em leito fixo. Nesse contexto, pode-se destacar o seguinte:

- Não somente exo e endo-PG são produzidas pelo fungo nesse meio de cultivo, mas outras enzimas de interesse comercial, tais como celulase, xilanase, amilase, avicelase, manganês peroxidase e lignina peroxidase.
- A melhor condição de produção da exo-PG em frascos foi no tempo 24 horas, 45 °C e 70% de umidade do substrato, enquanto que para a endo-PG foi no tempo de 144 horas.
- A mistura de farelo de trigo, bagaço de cana laçado e bagaço de cana de açúcar na proporção 40, 40 e 20% (peso) respectivamente, foi eficiente para o crescimento do fungo e produção enzimática, tanto nos ensaios em frascos e em reator de bancada.
- As características físico-químicas das exopectinases produzidas em escala de frasco e de biorreator de bancada foram muito semelhantes. A temperatura ótima da atividade enzimática foi de 60 °C e pH entre 4,0 e 5,0. Na ausência de substrato, a exo-PG manteve acima de 70 % da atividade entre os pHs 3,0 a 7,5, e manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora entre 25 e 50°C, decrescendo para cerca de 60% na temperatura de 60°C, ocorrendo perda quase total de atividade a 70°C. A enzima foi fortemente inibida principalmente pela presença de íons  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ .
- O fungo apresentou produção de endopectinase (acima de 1000 U/g) com condições ótimas de atividade a pH 5,5 e 60°C. A endo-PG manteve sua atividade acima de 70 % entre os pH 3,0 e 6,0, verificando-se 100 % de atividade entre o pH 5,0 e 5,5. A endo-PG, quando incubada a 37°C por 1 hora em ausência de substrato, manteve 100% da sua atividade, porém, quando incubada a 45°C perdeu 50% da atividade.

- Comparando a produção em escala de frasco e biorreator nas diferentes condições de operação foi observada produção ligeiramente maior na escala de frascos.
- Observou-se segregação de umidade no leito após a fermentação de 24 horas, ficando as regiões mais próximas da entrada mais secas do que a umidade inicial do meio e a região mais próxima à saída mais úmida. Tal segregação teve forte impacto negativo sobre a produção de exo-PG.
- A segregação de umidade foi evitada ao se introduzir bagaço de cana úmido antes e após o meio fermentativo, tornando a produção de enzimas mais uniforme.
- Nas fermentações feitas com 6 módulos, observou-se que a produção enzimática foi maior e a variação de umidade foi menor no sistema com aeração longitudinal comparada com a aeração radial.
- Observou-se picos de temperatura cerca de 3°C acima da temperatura adotada para a camisa e do ar de refrigeração e a inserção dos termopares no leito (radial e axialmente) teve pouca influência na coleta de dados de temperatura.

## **7. SUGESTÕES**

- Avaliar a cinética de transporte de massa (umidade) durante a fermentação.
- Reavaliar a arquitetura do reator:
  - verificar a real incidência do último módulo na condensação do vapor de água na saída do biorreator,
  - projetar o sistema de forma a esterilizar, umidificar e inocular o substrato “in situ”, facilitando a manipulação e operação do biorreator.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH A. G. L.; SULAIMAN N. M.; AROUA M. K.; NOOR M. J. M. M. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of food engineering**, v. 81, n1, p. 65-71, 2007.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, J. B. Solid substrate fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 28, p. 201-237, 1982.

AITKEN, M. D.; IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chysosporum*. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 276, p. 405-414, 1990.

ALAZARD, D.; RAIMBAULT, M. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 113-117, 1981.

ALIAKBARIAN, B; DE FAVERI, D; CONVERTI, A; PEREGO, P. Optimisation of olive oil extraction by means of enzyme processing aids using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, n. 42, p. 34-40, 2008.

ALANIA, F; GROVE, J, A; ANDERSON, W, A; MOO-YOUNG, M. Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, n. 44, p. 106-110, 2009.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n 1, p. 21-28, 1998.

ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA JR, N. E.; ANTRHANIKIAN, G. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. **Revista de microbiologia**, v.30, p. 287 – 298, 1999.

ARCHER, D. B.; JEENES, D. J.; MACKENZIE, D. A.; VAN LEEUWENHOEK, A. v. 65, p. 245, 1994.

ARORA, D. K.; BRIDGE, P. D.; BHATNAGAR, D. (eds.), **Handbook of fungal biotechnology**, MarcelDekker, New York, 2004.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A. E.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemistry Engineering Journal**, v.3, p. 141 -150, 1999.

ASNGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Incorporation of death kinetics into a 2D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 64, 253-260, 1995.

AURIA, R.; PALACIOS, J.; REVAH, S. Determination of the Interparticular Effective Diffusion Coefficient for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in Solid State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 898-902, 1992.

- AZEVEDO, J. A. M. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Isoflavonas Bioativas (daidzeína, genisteína) de Soja (*Glicine Max L. Merrill*) por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 2004. 50 p. 145.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BAHKALI, A. H. Production of cellulose, xylanase and polygalacturonase by *verticillium tricorpus* on different substrates. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 171 – 174, 1995.
- BARNBY, F. M.; MORPETH, F. F.; PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Klqveromyces marxianus*. 1. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 12, p. 891 – 897, 1990.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Mixed-solid substrate fermentation. A novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. **Acta Biotechnology**, v. 18, p. 315–324, 1998.
- BEUCHAT, L. R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeast and moulds. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 135–141, 1983.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 1–9, 1999.
- BHATTACHARYA, S.; RASTOGI, N. K. Rheological Properties of Enzyme-treated Mango Pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 249- 262, 1998.
- BON, E. P. S. – Enzimas na indústria de alimentos. *In* **Ciência de alimentos: avanços e perspectivas na América Latina**. D. B. Rodriguez-Amaya e G. M. Pastore ed., São Paulo, Fundação Cargill, 1997.
- BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42 p. 98, 2007.
- BRAND, D.; PANDEY, A.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; ROUSSOS, S.; BRAND, I.; SOCCOL, C.R. Relationship between coffee husk caffeine degradation and respiration of *Aspergillus* sp. in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, p. 169-177, 2002.
- BRASIL, I. M.; MAIA G. A.; FIGUEIREDO R. W. Physical-chemical changes during extraction and clarification of guava juice. **Food Chemistry**, V. 54, p.383-386, 1995.
- BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-185, 2001.
- CARVALHO, A. F. A.; LEITE, R. S. R.; MARTINS, E.; MARTIN, N.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Partially purified and characterization of the  $\alpha$ -glucosidase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 in submerged fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. S232. 2007.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.71, p.45 -50, 2000.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases by solid fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresearch Technology**, v.34, p. 181-186, 1999.

CELESTINO, S. M. C.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; VALLE DE SOUSA, M.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 33–42, 2006.

CHANDEL, A. K.; RUDRAVARAM, R.; RAO, L. V.; POGAKU, R.; NARASU, M. L. Industrial enzymes in bioindustrial sector development: An Indian perspective. **Journal of Commercial Biotechnology**, v.13, p. 283–291, 2007.

CHARLAN, G.; HOROWITZ, N. H. Membrane Permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. **Journal of Bacteriology**, n 117, p. 261-264, 1974.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. New York: Cambridge University Press, 1992, p.264.

CHEN, W. P.; ANDERSON, A. W. Purification, Immobilization, and Some Properties of Glucose Isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. **Applied Environment Microbiology**, v. 38, p.1111-1119 1979.

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

CHIN, L. H.; ALI, Z. M.; LAZAN, H. Cell wall modification, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 767-775, 1999.

COLOMBATTO D.; OULDA, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p. 145, 2004.

COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* RRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; DA COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, 2000.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; DEAMER, D. W. **Hydration dependent phase changes in biological membrane**, in: F. Franks, S. Mathias (Eds.), *Biophysics of Water*, Wiley, Chichester, UK, p. 295–299, 1982.

- DE LOECKER, R.; PENNINGCK, F.; KEREMANS, R. Osmotic effects of rapid dilution of cryoprotectants. I. Effect of human erythrocyte swelling, **Cryo-Lett.**, v. 8, p. 131–136, 1978.
- DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, Y.; 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.
- DEMIR, N., ACAR, J., SARIOGLU, K., MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, p. 47, p. 275-280, 2001.
- DEVI, N. A.; RAO, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 59-65, 1996.
- DIAZ-GODINEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 271, 2001.
- DINU, D.; NECHIFOR, M.T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 128–137, 2007.
- DOGAN, N.; TARI, C. Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 43-50, 2008.
- DOMÍNGUEZ, A.; RIVELA, I.; RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inertsupport. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 549–554, 2001.
- DORTA, B.; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 23, p. 501-505, 1998.
- DURAND, A. Bioreactor designs for Solid State Fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 113 – 125, 2003.
- EL-HAWARY, F. I.; MOSTAFA, Y. S. Factors affecting cellulose production by *Trichoderma koningii*. **Acta Alimentaria**, v. 30, p. 3-13, 2001.
- FANAEI, M. A.; VAZIRI, B. M. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p. 446–451, 2009.
- FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 221, 2006.
- FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.



- 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.
- FODA, M. S.; RIZK, I. R. S.; GIBRIEL, A. Y.; BASHA, S. I. Biochemical properties of polygalacturonase produced by *Aspergillus aculeatus* and *Mucor pusillus*, *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, v. 139, p. 463, 1984.
- FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. **Process Biochemistry**, p. 13-17, 1972.
- FREITAS, P. M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonases from newly isolated thermophilic *Monascus* sp N8 and *Aspergillus* sp N12 by Solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, 302-306, 2006.
- FREIXO, M. R.; KARMALI, A.; ARTEIRO, J. M. Production and chromatographic behaviour of polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 531-539, 2008.
- GADRE, R. V.; VAN DRIESSCHE, G.; VAN BEEUMEN J.; BHAT, M. K. Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 321–330, 2003.
- GAILING, M. F.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 69–74, 2000.
- GERVAIS, P.; BENSOUSSAN, M. **Solid-state fermentations of the genus *Aspergillus***, in: J.E. Smith (Ed.), *Aspergillus*, Plenum Press, New York, 1994, pp. 101–140.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85–101, 2003.
- GHIDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. E.; KRANTH, N. G. “Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients”. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 16, p. 253 – 257, 1994.
- GLENN, J. K.; AKILESWAREAN, L.; GOLD, M. H. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v.251, p.688-696, 1986.
- GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GHIDYAL, N. P.; KRANTH, N. G. Gas concentration and temperature gradients in a solid-state fermentor. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 611-620, 1993.
- GADRE, R. V.; VAN DRIESSCHE, G.; VAN BEEUMEN J.; BHAT, M. K. Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 321–330, 2003.

GRAJEK, W.; GERVAIS, P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 658-662, 1987.

GUGGENHEIN, E. A. **Thermodynamics: An Advanced Treatment for Chemists and Physicists**, 5th ed., North-Holland, Amsterdam, 1967.

GUTIERREZ – ROJAS, M.; TORRES, E. F. Curso de Fermentaciones en Medio- Sólido – Biotecnología para el Aprovechamiento de Resíduos Agroindustriales y Municipales. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992.

GUTIERREZ-ROJAS, M.; AMAR ABOUL HOSN, S.; AURIA, R.; REVAH, S.; FAVELA-TORRES, E. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 363–369, 1996.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation, **Biochemistry Engineering Journal**, v. 21, p. 265–272, 2004.

HARDIN, M. T; MITCHELL D. A. **Recent developments in the design, operation and modelling of bioreactors for solid-state fermentation**. In: Kaowai F, Sasaki K, editors. Recent Research Developments in Fermentation and Bioengineering, v. 1. Trivandrum: Research Signpost, 1998:205–22.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.

HASUNUMA, T.; FUKUSAKI, E. I.; KOBAYASHI, A. Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. **Journal of Biotechnology**, v. 106, p. 45-52, 2003.

HENRY, J. B. **Clinical Enzymology Pre-Workshop Manual**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1964. 288p.

HESELTIME, C. W. Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p. 517-532, 1972.

HESELTIME, C. W. Solid state fermentation – Parte I. **Process Biochemistry**. v. 4, p. 24-27, 1977.

HOLST, O.; MANELIUS, A.; KRAHE, M.; MÄRKL, H.; RAVEN, N.; SHARP, R. Thermophiles and Fermentation Technology. **Comparative Biochemical and Physiology**, v. 118 A, p. 415-422, 1997.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TIWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 409–18, 2000.

HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. “Extremozymes.” **Current Opinion Chemistry and Biology**, v. 3, p. 39 – 46, 1999.

ISMAIL, A. S. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 31, n 7, p. 645-650, 1996.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

JACOB, N.; NILADEVI, K. N.; ANISHA, G. S.; PREMA, P. Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. **Microbiological Research**, n. 163, p. 538—544, 2008.

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *melanocarpus albomyces* IIS – 68. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 705 – 709, 1995.

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

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

KALEGORIS, E.; FOUNTOUKIDES, G.; KEKOS, D. MACRIS, B. J. Design of a solid state fermentation bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 313-315, 1999.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKIS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural waste. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; SINGH, K.; DADICH, K. S.; HOONDAL, G. S. Application of alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncia*) bast fibers. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 803–807, 2001.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B, C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.23, p. 173-177, 1999.

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.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 239–243, 2004.

KHANAHMADI, M.; ROOSTAAZAD, R.; MITCHELL, D.A.; MIRANZADEH, M.; BOZORGMEHRI, R.; SAFEKORDI, A. Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation, **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 5354–5363, 2006.

KLUSKENS, L. D.; VTEAN ALEBEEK, GJ, W. M. ; WALTHER, J.; VORAGEN, A. G. J.; VOS, W. M.; van der OOST, J. Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from hyperthermophilic bacterium *Thermogota maritima*. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5464-5473, 2005.

KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Purification and kinetics of a raw starch-hydrolyzing, thermostable, and neutral glucoamylase of the thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae*. **Biotechnology progress**, v. 19, p. 936-944, 2003.

KUNTZ, I.D. Hydration of macromolecules III: hydration of polypeptides, polypeptides conformation in frozen solutions, **Journal of the American Chemistry Society**, v. 92, p. 514–518, 1971.

LAKSHMINARAYANA, K.; CHAUDAHARY, K.; ETHIRAJ, S.; TAURO, S. A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, p. 291-293, 1975.

LANDBO, A.; KAACK, K.; MEYER, A. S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 135-142, 2007.

LARROCHE, C.; DESFARGES, C.; GROS, J. B. Spore Production of *Penicillium roqueforti* by Simulated Solid State Fermentation. **Biotechnology Letters**. V.8. n.6, p. 453-456, 1986.

LAURENTINO, C.L. **Transferência de calor em leite fixo com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido**, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

LAZAN, H.; ALI, Z. M. Cell wall hydrolases and their potential in the manipulation of ripening of tropical fruits. **ASEAN Food**, v.8, p. 47-53, 1993.

LEADLAY, P. F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82p.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E., DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisoplae*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 657–661, 1999.

LIU, J.; YANG. J. Cellulase Production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in Solid-State Fermentation Using Lignocellulosic Waste from the Vinegar Industry. **Food Technology and Biotechnology**, n. 45, p. 420–425, 2007.

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 259-273, 1992.

- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.
- LUH, B. S.; PHAFF, H. I. Properties of yeast polygalacturonase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 48, p. 23-37, 1954.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 10<sup>a</sup> ed., 2003.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.
- MAHEVA, E.; DJELVED, G.; LARROCHE, C.; CROS, J.B. Sporulation of *Penicillium queforti* in Solid State Fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 97-102, 1984.
- MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state systems, **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 34, 1998.
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **Journal of Fermentation Technology**, v.54, p.267-286, 1976.
- MARGO, P.; VARVARO, L.; CHILOSI, G.; AVANZO, C. BALESTRA. G. M. Pectinolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 117, p. 1-6, 1994.
- MARTEL, M. B.; LÉTOUBLON, R.; FÈVRE, M. Characterization of some endo polygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. **Progress in Biotechnology**, v. 14, p. 769-774, 1996.
- MARTIN, N.; GUEZ, M.; LEITE, R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Study of pectinase produced by thermophilic fungi *Rhizomucor* sp. N31 in FES. **Abstracts / Journal of Biotechnology**, n. 131, S133–S187, 2007.
- MARTIN, N. **Isolamento de Linhagens Fúngicas Termofílicas Produtoras de Pectinases Termoestáveis: Produção, Caracterização e Purificação Parcial da Poligalacturonase**, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949-954, 2002.
- MEDYANTSEVA, E. P.; VERTLIB, M. G.; BUDNIKOV, G. K. Metal ions as enzyme effectors. **Russian Chemical Reviews**, v. 67, p. 225-232, 1998.
- MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007.

- MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus auranticus* from sugar cane bagasse in aerated growth fermentator. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1387-1391, 2004.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
- MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F. D. H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 15-26, 2004.
- MOO-YOUNG, M.; MORIERA, A. R.; TENGEDY, R. P. **Principles of solid state fermentation**, in: J.E. Smith, D.R. Berry, B. Kristiansen (Eds.), *The Filamentous Fungi*, vol. 4, Fungal Technology, Arnold, London, 1983, pp. 117-144.
- MUDGETT, R. E. Solid State Fermentation In: DEMAIN A. L., SOLOMON N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 66-84. MYLNER, 2004.
- NAGAI, M.; KATSURAGI, T.; TERASHITA, T.; YOSHIKAWA, K.; SAKAI, T.; Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 64, p. 1729-32, 2000.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NISHIO, N.; TAI, K.; NAGAI, S. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. **European Journal Microbiology and Biotechnology**, n. 8, p. 263-270, 1979.
- NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*, **Microbiology Research**, v. 159, p. 305, 2004.
- NORTHOLT, M.D., VAN EGMONT, H.P., PAULSCH, W.E. Ochratoxine: a production by some fungal species in relation to *aw* and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 42, p. 485-490, 1984.
- ORIOLE, E. **Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau**. Thèse de Doctorat Microbiologie, INSA Toulouse, 27 Juin 1987, 113p.
- ORIOLE, E.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Water and water activity in the solid-state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 27, p. 498-503, 1988.
- PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v.13, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 1-4, 2002.

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

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed Column Bioreactor for Production of Enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 14, p. 486-488, 1992.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. **Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes**. In: Current Science, v. 77. n.1, p. 149-161, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUES-LEON, J. A .; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. 2001. 221p.

PARRY, N. J.; BEERVER, D. E.; OWEN, E.; NERINCKX, W.; CLAEYSSENS, M.; VAN BEEUMEN, J.; BHAT, M. K. Biochemical characterization and mode of action of a thermoestable endoglucanase purified from *Thermoascus auranticus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 404, p. 243-253, 2002.

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, 2006a.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2340, 2006b.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, Conceitos e Aplicações**, v. 1, 2ª ed., S.P.: Markron Books, 1996.

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

PIRET, M. J.; DEMAIN, A. L., 1988. **Actinomycetes in biotechnology**. In: Goodfellow, M., Williams, S.T., Mordarski, M. (Eds.), Actinomycetes in Biotechnology. Academic press, London, pp. 461–482, 1988.

QUINN, P.Y. A lipid phase separation model for low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, p. 128–146, 1985.

RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: Produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca**. Dissertação apresentada na UNESP / IBILCE – São José do Rio Preto, para a obtenção do título de mestre, 2002.

- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161–179, 2006.
- RAGHAVARAO, K. S. M.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 149-155, 2003.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, Issue of August 15, 1998.
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid State Fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.9, p. 199-209, 1980.
- REID, I.; RICHARD, M. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 34, p. 499-504, 2004.
- REVILLA, I.; GONZALEZ-SAN JOSE, M, L. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. **Int Journal Food Science Technology**, v. 38, p. 29–36, 2003.
- REYES, N.; RIVAS-RUIZ, I.; DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, R.; SOLÍS, S. Influence of immobilization parameters on endopolygalacturonase productivity by hybrid *Aspergillus* sp. HL entrapped in calcium alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 43–48, 2006.
- RIDDER, E. R., NOKES, S. E., KNUTSON, B.L. Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system, **Transactions of the ASAE**, n. 42, v. 1785–1790, 1999.
- RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases em reator de coluna por fermentação semi-sólida de bagaço de laranja industrializado**. Campinas, 2004. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- RODRIGUES, M. I. **Modelagem, Simulação e Controle de um Processo Contínuo de Purificação de Enzimas**. Campinas, 1993. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RODRÍGUEZ-COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291, 2006.
- SAAD, N.; BRIAND, M.; GARDARIN, C.; BRIAND, Y.; MICHAUD, Ph. Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL 1894. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 800–805, 2007.
- SAITO, K.; TAKAKUWA, N.; ODA, Y. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC. **Microbiology Research**, v.159, p. 83-86, 2004.
- SALAZAR, L.; JAYASINGHE, U. **Fundamentals of purification of plant viruses**. In: Techniques in plant, virology, CIP., Training Manual, J.O., Virus Purification, International Potato Centre, Peru, 1999:1–10.



SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Validation of a model describing two dimensional dynamic heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 739-749, 1998.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 643 - 646, 1999.

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

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B. K.; KRISHNAIAH, M. M.; NAVARRO, J. M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces Castellii* in a solid state fermentation system. **Process Biochemistry**. v. 27, p. 97-107, 1992.

SCANDURRA, R.; CONSALVI, V.; CHIARALUCE, R.; POLITI, L.; ENGEL, P. C. Protein thermostability in extremophiles. **Biochemistry**, v.80, p.933-941, 1998.

SCHNITZHOFFER, W.; WEBER H. J.; VRSANSKÁ, M.; BIELY, P.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G. M. Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1739–1747, 2007.

SCHWAN, H. P. Electrical properties of bound water. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 125, p. 344–35, 1965.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 234-244, 1997.

SCOTT, D. **Enzymes, industrial**. In: Grayson M, Ekarth D, Othmer K, editors. Encyclopedia of chemical technology. New York: Wiley; 1978. p. 173–224.

SEGEL, I. H. **Biochemical Calculations**. Cap. 4. Enzymes. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1976. 441p.

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

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 318-324, 2002.

SIN, H. N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; ABD. RAHMAN, R. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 313–319, 2006.

SINGH, R. F.; COOPER, R.M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v 25, p 420-425, 1999.

SINGH, S. A.; RAO, A. G. A. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 35, p. 115–123, 2002.

SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B. A. Thermal stability of beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26(7), p. 502-508, 2000.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, (2009), doi: 10.1016/j.jeb.2008.10.019 (in press).

SOARES, V. L. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal- Association of official analytical chemists**, v. 72, n. 1, 1989.

SOCCOL, C. R. **Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique**. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, 1992. 218 p.

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

SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 455-458, 2003.

SPOONER, F. R.; HAMMERSCHMIDT, R. Characterization of extracellular pectic enzymes produced by *Streptomyces* sp. **Phytopathology**, v. 79, p. 1190, 1989.

STUART, D. M.; MITCHELL, D. A.; JOHNS, M. R.; LITSTER, J. D. Solid state fermentation in rotating drum biorreactors: operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. **Biotechnology Bioengineering**, v. 63, p. 383-391, 1999.

SUNNOTEL, O.; NIGAM, P. Pectinolytic activity of bacteria isolated from soil and two fungal strains during submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 835-839, 2002.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. **Hidrólise do Amido**. In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. v. 3. Cap. 15. 2003. p. 377-395.

TALLU, B. **Aroma production**, Postgraduate in Food Sciences, University of Clermont-Ferrand, France, 1986.

- TANGERDY, R. P. Solid State Fermentation. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 96-99, 1985.
- THOMÉO J. C.; GRACE J. R. Heat transfer in packed beds: experimental evaluation of one-phase water flow. **Brazilian Journal of Chemistry Engineering**, n. 21, p.13-22, 2004.
- TIEN, M.; KIRK, K. T. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K.; Kellogg, S. T. **Methods Enzymology**, v. 161, part B, p. 238-249, 1988.
- TODD, W. G. **Water deficits and enzymatic activity**, in: T.T. Kozlowski (Ed.), Plant Response and Control of Water Balance, vol. 3, Water Deficits and Plant Growth, Academic Press, New York, 1972, pp. 117–216.
- TUNGA, R.; TUNGA, B. S. **Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation**. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University, 2003. 12p.
- USTOK, F. I.; TARI. C.; GOGUSB, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 322, 2007.
- VAILLANT, F.; ILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using cross flow micro filtration. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 83-90, 2001.
- van de LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. **Chemical Engineering Journal**, v. 84, p. 115–123, 2001.
- VANDENBERGHE, L. **Développement d'un Procédé pour la Production d'Acide Citrique par Fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l'Agro- Industrie du Manioc**. Thèse de Docteur de UTC. Université de Technologie de Compiègne, 2000. 205 p.
- VÁZQUEZ, C.; PATIÑO, B.; MARTÍNEZ, M. J. Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p, 191-196, 1993.
- VIELLE, C.; ZEIKUS, J. G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.
- VIIKARI, L.; TENAKANEN, M.; SUURNAKKI, A. **Biotechnology in the pulp and paper industry**. In: Rehm HJ, editor. Biotechnology. VCH-Wiley; 2001. p. 523–46. 38:987–96.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring**. In: Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M, Niniestra-Gonzalez, editors. Advances solid state fermentation. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 1997:23-37.
- WANG, L.; YANG, S.T. Bioprocessing **for Value-added products from renewable resources**, Elsevier B.V. Chapter 18. Solid State Fermentation and Its Applications, 2007.

WARD, O. **Biotecnología de La Fermentación: Principios, Procesos y Productos.** Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989. p. 64-67 y 233-247.

WOLFE, J.; STEPONKUS, P. L. Tension in the plasma membrane during osmotic contraction, **Cryo-Lett.**, v. 4, p. 315–322, 1983.

YASUHARA, A.; OGAWA, A.; TANAKA, T.; SAKIYAMA, T.; NAKANISHI, K. Production of neutral protease from *Aspergillus orizae* by a novel cultivation method on microporous membrane. **Biotechnology Techniques**, v.8, p. 249-252, 1994.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 825-830, 2000.

ZILIOLI, P. C.; WOICIECHOWSKI, A. L. ; PANDEY, A. ; SOCCOL, C. R. **Xanthan Gum Production by Solid-State Fermentation using Cassava Bagasse as Carbon Source.** In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, 2004. v. 1. p. 52.