

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos

Alberdan Silva Santos
(Organizador)



Atena
Editora

Ano 2018

Alberdan Silva Santos
(Organizador)

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

A946 Avanços científicos e tecnológicos em bioprocessos [recurso eletrônico] / Organizador Alberdan Silva Santos. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-47-5

DOI 10.22533/at.ed.475180110

1. Bioprocessos. 2. Bioquímica. 3. Biotecnologia. I. Santos, Alberdan Silva.

CDD 553.7

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos é uma obra que reúne vinte e três capítulos com temas em pesquisas científicas realizadas no campo da biotecnologia, e que envolve agentes biológicos e bioquímicos na geração de produtos ou processos. Nesta obra se concentram diversos avanços descritos nas metodologias e nos resultados, distribuídos em quatro tópicos principais, envolvendo: processos químicos e biotecnológicos no aproveitamento de resíduos; produção de metabólitos e enzimas; métodos analíticos e de simulação; e biotratamentos envolvidos na geração de energias. Esta obra foi escrita por jovens pesquisadores brasileiros que estão desenvolvendo suas teses e/ou dissertações em instituições nacionais. Por este motivo, os aspectos inovadores e o alcance dos resultados apresentados podem ser um grande estímulo para aqueles que visam conhecer com maior amplitude alguns dos aspectos biotecnológicos estudados em algumas das instituições de nosso país.

Alberdan Silva Santos

SUMÁRIO

EIXO 1: PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS

CAPÍTULO 1 1

AMYLASES IN PROTEIN SECRETOME PROFILE FROM *Aspergillus sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT INTEGRAL STARCH

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
Rubens Menezes Gobira
Ricardo Felipe Alexandre de Mello
Hellen Kempfer Phillippsen
Nelson Rosa Ferreira
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 2 7

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR MICROBIANA PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM ESCALA LABORATORIAL

Rafael Firmani Perna
Josivan de Sousa Cunha
Sergio Andres Villalba Morales
Michelle da Cunha Abreu Xavier
Cristiane Angelica Ottoni
Elda Sabino da Silva
Alfredo Eduardo Maiorano

CAPÍTULO 3 23

ENZYMATIC COCKTAIL PRODUCED BY *Fusarium sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT CRUDE CASSAVA STARCH (*Manihot esculenta Crantz*).

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
Elaine Cristina Souza Medeiros
Rubens Menezes Gobira
Ricardo Felipe Alexandre de Mello
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 4 28

THE SYSTEMATIC INVESTIGATION OF L-ASPARAGINASE PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI

Eliane Silva e Silva
Alberdan Silva Santos
Márcia Gleice da Silva Souza
Rubens Menezes Gobira
Maria Inez de Moura Sarquis

CAPÍTULO 5 33

EVALUATION OF METHYLOCYSTIS HIRSUTA GROWTH ON SUPPLEMENTED MINERAL MEDIA USING METHANE AS CARBON SOURCE

Rodrigo Pimentel Fernandes
Ana Cristina Pantoja Simões
Manuela Temtemples de Carvalho
Camila Ruiz Lopes
Nei Pereira Jr

CAPÍTULO 6 37

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMATIC EXTRACT WITH CELULOLYTICAL ACTIVITY FROM AGROINDUSTRY RESIDUES

Ivanilton Almeida Nery
Karine Belo Rocha de Lima
Marlon Castro da Silva
Edmir Fernandes Ferreira

EIXO 2: APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E QUÍMICOS

CAPÍTULO 7 41

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA PALMA DE ÓLEO (*ELAEIS SP*) PARA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *PLEUROTUS OSTREATUS*

Jhonatas Rodrigues Barbosa
Maurício Madson dos Santos Freitas
Marcos Enê Chaves Oliveira

CAPÍTULO 8 50

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 E DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS DE FRUTAS COMO SUBSTRATOS

Camylla Carneiro Soares
Adrielly Silva Albuquerque de Andrade
Fábio Cirqueira da Silva
Andréa Farias de Almeida
Janice Izabel Druzian
Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato

CAPÍTULO 9 65

ESTUDO DO REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA CACAUEIRA.

Rhuany de Oliveira Silva
Iara Rebouças Pinheiro
Isabela Nascimento Tavares Ferreira

CAPÍTULO 10 70

BIOPRODUCTS FROM *Trichoderma harzianum* AS INDUCER OF RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEANS

Emanuele Junges
Marlove Fátima Brião Muniz
Ângela Diniz Campos
Thiarles Brun
Cleudson José Michelin
Marcio Antônio Mazutti

CAPÍTULO 11 81

ANALYSIS OF PRE-TREATMENT OF PINEAPPLE WASTE WITH HYDROGEN PEROXIDE IN THE OBTENTION OF TOTAL REDUCING SUGARS

Fernanda Ferreira Freitas
Lorena Costa Vasconcelos Macedo

Carlos Alberto Galeano Suarez
Araceli Aparecida Seolato
Inti Doraci Cavalcanti-Montaño,
Paula Rubia Ferreira Rosa

EIXO 3: MÉTODOS ANALÍTICOS, CINÉTICA, SIMULAÇÃO E MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS EM PROCESSOS

CAPÍTULO 12 86

USE OF LINEAR EQUATIONS FOR DETERMINATION OF APPARENT KINETIC PARAMETERS IN CELLULOLYTIC MEDIUM WITH *Trichoderma virens*

Nelson Rosa Ferreira
Suelem Paixão da Silva
Rubens Menezes Gobira
Maria Inez de Moura Sarquis
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 13 92

PRODUCTION OF COMMON ORANGE FERMENTED BEVERAGE: KINECTIC STUDY AND SENSORY ANALYSIS

Jacqueline de Moraes Campêlo
Olga Martins Marques

CAPÍTULO 14 97

MATHEMATICAL MODELING OF GLUCOSE ACCUMULATION DURING ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CARRAGEENAN WASTE

Samuel Conceição Oliveira
Fernando Roberto Paz Cedeno
Fernando Masarin

CAPÍTULO 15 104

PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Metarhizium anisopliae* POR CULTIVO SÓLIDO EM BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO COM ROTAÇÃO INTERMITENTE: APLICAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PREDIÇÃO DE PERFIS DE TEMPERATURA

Érika Fernanda Rezendes Tada
Lucas Portilho da Cunha
João Cláudio Thoméo

CAPÍTULO 16 121

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE EFETIVIDADE PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS USANDO MÉTODOS DE REGRESSÃO SIMBÓLICA VIA PROGRAMAÇÃO GENÉTICA

Félix Monteiro Pereira
Luciano Eduardo Gomes Junior
Fabrício Maciel Gomes
Messias Borges Silva
Samuel Conceição Oliveira

CAPÍTULO 17 133

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD, BY SPECTROSCOPY IN THE MIDINFRARED, AND MULTIVARIATE CALIBRATION FOR ETHANOL QUANTIFICATION IN THE FERMENTED MANGO

PULP (*Mangifera indica* L.) VARIETY BACURI.

Rubens Menezes Gobira
Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
Ricardo Felipe Alexandre de Mello
Graziela Cristiane Telles da Silva
Sanclayton Geraldo Carneiro Moreira
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 18 138

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO PARA ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anderson dos Santos Barbosa
Danyelle Andrade Mota
Lays Carvalho de Almeida
Juliana Lisboa Santana
Nayára Bezerra Carvalho
Sílvia Regina Soares Martins

CAPÍTULO 19 156

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS E DA CORDO EXTRATO DE *Eugênia involucrata* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE AGENTES CONSERVANTES NA TEMPERATURA DE 90°C

Lauren Menegon de Oliveira
Francine Antelo

EIXO 4: BIOTRATAMENTOS PARA GERAÇÃO DE ENERGIA E BIOPRODUTOS

CAPÍTULO 20 163

BIOTRATAMENTO DE VINHAÇA SINTÉTICA E GERAÇÃO DE ELETRICIDADE UTILIZANDO UMA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA

Cristiane Angélica Ottoni
Marta Filipa Simões
Jonas Gomes dos Santos
Luciana Peixoto
Rodrigo Fernando Brambilla de Souza
Almir Oliveira Neto
Antônio Guerreiro de Brito
Alfredo Eduardo Maiorano

CAPÍTULO 21 172

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA GASEIFICAÇÃO DO LODO DE ESGOTO SANITÁRIO

Renan Barroso Soares
Ricardo Franci Gonçalves

CAPÍTULO 22 179

BIOPROSPECTING CAROTENOIDS PRODUCTION IN THREE BRAZILIAN MICROALGAE SPECIES

Sabrina da Silva Mesquita
Natália Guimarães Figueiredo
Inaiã Costa Cutrim
Simone Carvalho Chiapetta
Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira
Eliana Flávia Camporese Sérvulo

CAPÍTULO 23 184

EFFECT OF TEMPERATURE AND SALINITY ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND LIPIDS BY MARINE MICROALGA

Nicéia Chies Da Fré
Alessandro de Oliveira Rios
André Jablonski
Rosane Rech
Nilson Romeu Marcílio

SOBRE O ORGANIZADOR..... 193

AMYLASES IN PROTEIN SECRETOME PROFILE FROM *Aspergillus sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT INTEGRAL STARCH

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira

Federal Institute of Amapá - IFAP / Federal
University of Para-UFPA, Network Bionorte
Belém - Pará

Rubens Menezes Gobira

Federal University of Para-UFPA, Network
Bionorte
Belém - Pará

Ricardo Felipe Alexandre de Mello

Federal University of Pará, UFPA, Institute of
Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

Hellen Kempfer Phillippsen

Federal University of Pará, UFPA, Institute of
Biological Sciences – ICB
Belém - Pará

Nelson Rosa Ferreira

Federal University of Pará, UFPA, Technology
Institute - ITEC
Belém - Pará

Alberdan Silva Santos

Federal University of Pará, UFPA, Institute of
Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

ABSTRACT: Fungi have been strategically used as molecule producers of economic interest in the last decades, such as: enzymes, antibiotics, vitamins, amino acids and steroids; and the search for new enzymes or

enzymatic systems that have the potential of deconstructing integral starch, has been one of the targets of our research group. In this aspect, the objective of this study was the investigation of the secretome of *Aspergillus sp* in the search of hydrolytic enzymes, using cassava starch (*Manihot sculenta* Crantz) as substrate. Two-dimensional electrophoresis technique was applied to investigate the enzymatic profile and to verify its potential application as an enzymatic cocktail. The best enzyme production occurred in 96 hours of microorganism cultivation, also obtaining better amyolytic activity during this period, verifying the deconstruction of the starch and the generation of reducing sugars, mainly glucose in the reaction medium. In the overall profile of the enzymes performed by 2D electrophoresis, 29 protein spots were detected and will be identified after soon.

KEYWORDS: Enzymes. Hydrolysis. Proteomics

1 | INTRODUCTION

Mineral hot acids can depolymerize starch molecules, like all other polysaccharide molecules, although to hydrolyze the starch to obtain glucose, three or four enzymes are essential (FENNEMA, 2010). Several organisms have the ability to produce enzymes that deconstruct the starch and thus release

glucose for using in their energy metabolism. Microbial cells are important producers of enzymes and have many advantages, such as the fact that production can be increased easily, are relatively easy to grow in a controlled environment and are highly sensitive to genetic alterations, allowing the production of improved the productivity and type of enzyme produced (SANTOS, 2007).

2 | METHODOLOGIES

2.1 Solid Cultivation of filamentous fungus

The *Aspergillus* sp, belonging to the Systematic research laboratories in biotechnology and Molecular Biodiversity at the Federal University of Pará (UFPA), was grown in a petri dish (80 x 15 mm) with middle GPY-agar (20 g/L of glucose, peptone 5 g/L, 5 g/L yeast extract, 20 g/L of agar and 0.1 g/L of Clorafenicol), incubated in an oven at 37° C until growth and a disk (5mm) of mycelium was transferred to new petri dish (80 x 15 mm) with solid APY (5 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 20 g/L of agar and 0,1 g/L of clorafenicol) for adaptation to starchy substrate.

2.2 Submerged Cultivation filamentous fungus

Cultivation occurred in two stages: the first (precultivation) in a 250 mL conical flask, were prepared 120 ml of a medium consisting of starchy substrate (10 g / L), glucose (10g / L), peptone (1 g / L) and salts solution: solution 50 mL / L (KH₂PO₄ 40 g / L (NH₄)₂SO₄ 28 g / L); Solution B 10 ml / l (CaCl₂ · 2H₂O 30g / L); C Solution 2 mL / L (CH₄N₂O 150 g / L); Solution D 2mL/L (MgSO₄·7H₂O 150g/L FeSO₄·7H₂O 2,5 g/L CoCl₂·6H₂O 1g/L MnSO₄·H₂O 0,8g/L ZnSO₄·7H₂O 0,7g/L); And sterilized in autoclave at 121 ° C for 15 minutes. By stabilizing the temperature to 25°C ambient 10 was inoculated disks (5mm) of the *Aspergillus* mycelia (growing adapted to solid substrate) and incubated on shaker orbital At 30 °C, 130 rpm for 72h. In the second step, transferred 20 mL of liquid medium containing pieces of biomass *Aspergillus* sp for new flask of 500ml containing 200ml of sterile growth medium consisting of starchy substrate (20 g / l) and peptone (1 g / L) Was incubated in an orbital shaker, under the same pre-culture conditions, for a period of 8 days. During the incubation period, 2 ml aliquots were removed every 24 h which were centrifuged at 5,000 rpm for 5 minutes and the supernatant used for amylase activity analysis, protein quantification and quantification of reducing sugars.

2.3 Evaluation of amylase activity by quantifying Residual Substrate

The amylase activity is based on a colorimetric method, developed by blue color when there is the formation of starch-iodine complex as Xiao et al (2006).

2.4 Quantification of protein

The determination of the enzymatic extract proteins was made by the Bradford method (Bradford, 1976), dosing soluble proteins.

2.5 Quantification of reducing sugars

The reducing sugars of enzymatic hydrolysis were defined by DNS method proposed by Miller (1959), adapted by LablSisbio.

2.6 2D Electrophoresis Gel

A total of 125 µg of purified protein was precipitated by using methanol and chloroform (FIC et al. 2010). The protein samples were treated with 125 µL of buffer containing urea, thiourea 7 M 2 M, 3-[(3-Cholamidopropil) dimethylammonium chloride]-1-propanosulfonato (CHAPS) 130 mM dithiothreitol 0.002% (w/v) buffer containing anfólito (IPG CAP, GE Healthcare) and traces of bromophenol blue (FIC et al. 2010). The samples were loaded on an Immobiline™ of 7 cm DryStrip gel (GE Healthcare) with a range of linear separation of 4-7 pH. Isoelectric focusing was conducted using a system of Ettan IPGphor isoelectric focusing III (GE Healthcare) to 20° C by using the program, according to the manufacturer's instructions. Focusing isoelectronic strips were transferred to a balance Cap containing 18 mM DTT during 20 minutes as previously described (HERBERT et al., 2001). The strips were then transferred to a fresh balance buffer containing 135 mM iodoacetamide and incubated for 20 minutes. Each IPG Strip was placed on top of a polyacrylamide gel SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) in racing CAP, 25 mM Tris-HCl, glycine 192 mM, SDS to 0.1% (w/v). The SDS-PAGE gels were run to 10° C during 1 hour at 150 V and increased to 250 V for 3 hours. Proteins were stained with silver (PlusOne™ Silver staining Kit, GE Healthcare) according to the manufacture's instructions, but without glutaraldehyde. Analysis of image-the images of three biological replications of each condition was obtained using 2-D gels from Silverstained using the Imagescan (GE Healthcare).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The production or release of glucose occurs to degradation of starch used as carbon source and inductor, by the action of hydrolase produced by microorganisms, this release of glucose was evidenced from the determination of reducing sugar (Figure 1), reaching your highest peak of production or release in 96 hours.

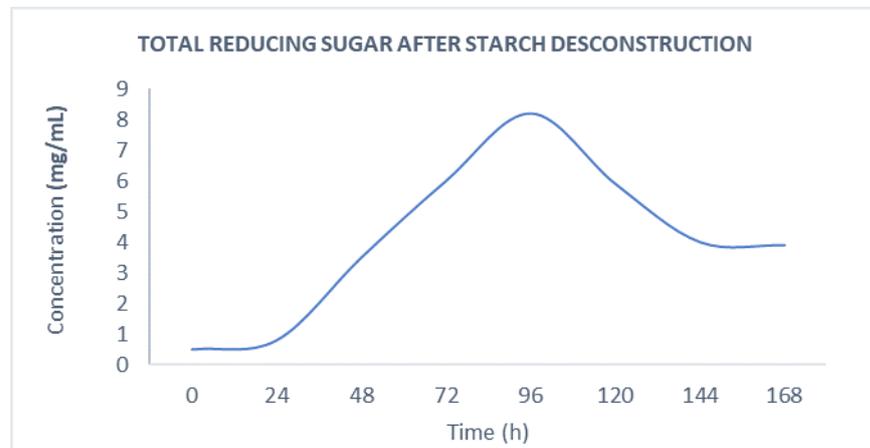


Figure 1: Quantification of STR

It was observed that in the course of cultivation, enzymatic growth of total protein (Figure 2) reaching 1.2 mg/mL in 96 hours was accompanied by the consumption of starch and the appearance of residual sugars, suggesting that as the microorganisms reproduce, the same is able to secrete amyolytic enzymes that promote the hydrolysis of starch, with production of residual sugars. The activity shown in the determination of residual starch shows that enzymes hydrolyze the starch molecules in your interior, with amyolytic 2.2 activity U/mL (Figure 3).



Figure 2: Protein Quantification



Figure 3: Use of integral starch in Aspergillus amylase activity analysis.

The protein profile of *Aspergillus* secretome was made during the deconstruction of starch, through two-dimensional PAGE, reaching optimum conditions of production on the fifth day of culture. Through the gel image, a total of 29 protein spots were observed (Figure 4)

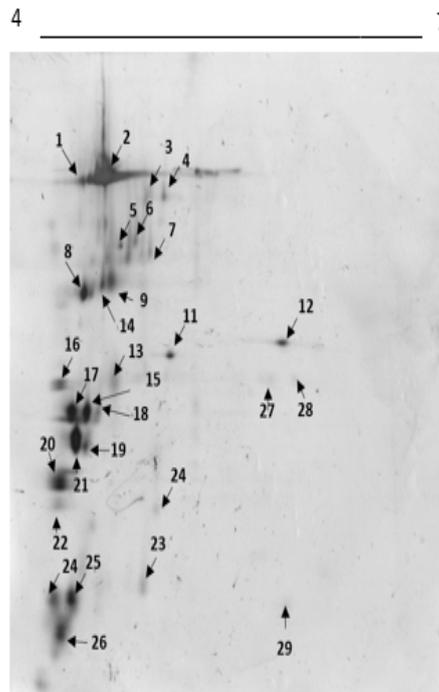


Figure 4. Gel-2D in the detection of Proteins secreted by *Aspergillus* during starch deconstruction conditions.

4 | CONCLUSIONS

The *Aspergillus sp.* produced a concentrated of amylase enzymes that proved to be efficient in the deconstruction of cassava starch, obtaining satisfactory levels of glucose. The secreted proteins showed on gel stain a diversity and quantities that are important for the deconstruction of the starch. This enzymatic system will be used to obtain fermentable sugars for second-generation ethanol production from natural source, considered recalcitrant, although the results showed a promising production of these enzymes by a micro-organism naturally adapted.

REFERENCES

BRADFORD, M. (1976) **A rapid sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** Analytical Biochemistry, v 72, p 248-254, 1976.

Fic. E., Kedracka-Krok. S, Jankowska. U, Pirog. A, Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010) **“Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis”** Electrophoresis, 31, 3573–3579.

HERBERT, B.; GALVANI, M.; HAMDAN, M.; OLIVIERI, E.; MACCARTHY, J. (2001). **Reduction and**

alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how?
Electrophoresis. 22, 2046–2057.

LAEMMLI, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 227, 680-685.

MILLER, G. L. (1959) **“Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar”**, Anal. Chem.11, 426-428.

SANTOS, S. F. M. (2007) **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 132 p.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. (2006) **A quantitative sarch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucomylase activities.** Analytical Biochemistry, 351: 146 – 148.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR MICROBIANA PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM ESCALA LABORATORIAL

Rafael Firmani Perna

Josivan de Sousa Cunha

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

Cristiane Angelica Ottoni

Elda Sabino da Silva

Alfredo Eduardo Maiorano

RESUMO: Os fructooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose cujas unidades frutossil estão ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) na molécula de sacarose. Esses açúcares, de baixa caloria, são classificados como prebióticos e, portanto, apresentam diversos benefícios à saúde humana. Os FOS são disponibilizados comercialmente por meio da produção sintética, utilizando enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) e sacarose como substrato. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa utilizando meio de cultura sintético, assim como realizar a caracterização bioquímica da enzima por meio da avaliação dos efeitos do pH ($3,0 \leq \text{pH} \leq 6,5$) e da temperatura ($30 \text{ }^\circ\text{C} \leq T \leq 65 \text{ }^\circ\text{C}$) do meio reacional nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossililação (A_t). Em 64 h de fermentação, foram produzidas FTases com as maiores atividades de transfrutossililação ($19,76$

$\pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$) e menores atividades hidrolíticas ($1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$), resultando numa razão entre atividades (A_t/A_h) igual a $12,22 \pm 1,82$. Com relação aos estudos de caracterização bioquímica, a enzima apresentou máxima atividade de transfrutossililação e mínima atividade hidrolítica no meio reacional para uma faixa de pH de 4,5-6,0 e temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos atestaram que o fungo se destacou como fonte produtora de FTases extracelulares e estas, por sua vez, mostraram-se promissoras para a síntese de FOS em escala laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE: Frutossiltransferase, *Aspergillus oryzae* IPT-301, Fermentação submersa, Caracterização enzimática, Fructooligossacarídeos.

ABSTRACT: Fructooligosaccharides (FOS) are fructose oligomers whose fructosyl units are attached at the β (2 \rightarrow 1) position in the sucrose molecule. These sugars are classified as prebiotics and present several benefits to human health. FOS are commercially available through synthetic production using microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) and sucrose as substrate. The aim of this work was to study the extracellular FTase production from *Aspergillus oryzae* IPT-301 by submerged fermentation using synthetic culture medium, and to perform the biochemical

characterization of the enzyme through the evaluation of the effects of pH ($3.0 \leq \text{pH} \leq 6.5$) and the temperature ($30^\circ \text{C} \leq T \leq 65^\circ \text{C}$) of the reaction medium on hydrolytic (A_h) and transfructosylation (A_t) activities. FTases were produced with the highest transfructosylation activities ($19.76 \pm 0.56 \text{ U.mL}^{-1}$) and lower hydrolytic activities ($1.65 \pm 0.31 \text{ U.mL}^{-1}$) at 64 h of fermentation, resulting in a ratio between activities (A_t / A_h) equal to 12.22 ± 1.82 . Regarding the biochemical characterization, the enzyme presented maximum transfructosylation activity and minimal hydrolytic activity in the reaction medium for a pH range of 4.5-6.0 and temperature of 50°C . The results suggest that the fungus is a promising source for production of extracellular FTases for the synthesis of FOS in laboratory scale.

KEYWORDS: Fructosyltransferase, *Aspergillus oryzae* IPT-301, Submerged fermentation, Enzymatic characterization, Fructooligosaccharides.

1 | INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose cujas unidades frutossil estão ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) na molécula de sacarose (YUN, 1996; CHEN e LIU, 1996; CHEN *et al.*, 2014; ROMANO *et al.*, 2016). Os FOS de baixo grau de polimerização, tais como a kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose (Figura 1), são de grande importância por apresentarem propriedades benéficas à saúde humana (HIRAYAMA *et al.*, 1993; YUN, 1996; ANTOŠOVÁ *et al.*, 2008). Estes açúcares são de baixa caloria, prebióticos e podem ser consumidos, seguramente, por diabéticos, não são cariogênicos, favorecem o aumento da absorção de cálcio e magnésio pelo organismo (DÍAZ *et al.*, 2011) e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade das bifidobactérias na microbiota intestinal (MOORE *et al.*, 2003; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; DOMINGUEZ *et al.*, 2014), ajudando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (GIBSON e ROBERFROID, 1995; GANAIE *et al.*, 2014). Os FOS ainda auxiliam na redução do colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidios no sangue (TOKUNAGA *et al.*, 1986; ROBERFROID, 2007). Esses oligômeros apresentam cerca de 40 a 60 % do poder edulcorante da sacarose, sendo usados frequentemente pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos como açúcares funcionais (YUN, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2016).

Embora os FOS estejam presentes em diversos vegetais, esses açúcares são disponibilizados comercialmente por meio da produção sintética via rota enzimática, utilizando a sacarose como substrato e enzimas de origem microbiana denominada frutossiltransferase (E.C. 2.4.1.9) (CHIEN *et al.*, 2001; ROMANO *et al.*, 2016). Esta enzima é sintetizada por cepas fúngicas, tais como *Penicillium* sp. (USAMI *et al.*, 1991; LIM *et al.*, 2005; GANAIE *et al.*, 2014), *Aureobasidium* sp. (LATEEF *et al.*, 2007; DOMINGUEZ *et al.*, 2012), *Fusarium* sp. (GUPTA e BHATIA, 1982; PATEL *et al.*, 1994) e, principalmente, por *Aspergillus* sp. (CHEN e LIU, 1996; L'HOCINE *et*

al., 2000; CHIEN *et al.*, 2001; WANG e ZHOU, 2006; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; SÁNCHEZ *et al.*, 2008; MUSSATTO e TEIXEIRA, 2010; OTTONI *et al.*, 2012; MÁRQUEZ *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2016). As enzimas microbianas produtoras de FOS são excretadas para fora das células como enzimas extracelulares e/ou aderidas nas células microbianas como enzimas miceliais (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; GANAIE; GUPTA, 2014).

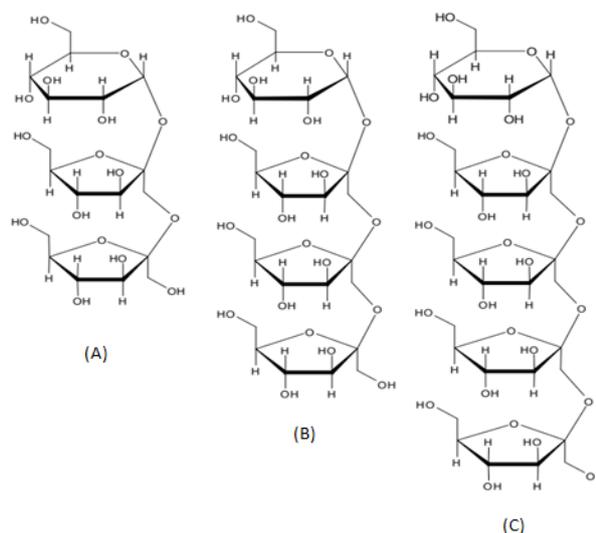


Figura 1. Estrutura molecular dos frutooligossacarídeos: (A) kestose, (B) nistose e (C) β -frutofuranosilnistose.

Afrutossiltransferase (FTase) exibe, majoritariamente, atividade de transfrutosilação (A_t), sendo responsável pela transferência de grupos frutossil entre moléculas de sacarose. Portanto, por meio da reação enzimática, são liberadas moléculas de glicose como subprodutos no meio reacional e geradas moléculas de frutooligossacarídeos (FOS) com diferentes tamanhos de cadeia polimérica (ANTOŠOVÁ *et al.*, 2008; GANAIE *et al.*, 2014; MÁRQUEZ *et al.*, 2016). Além disso, por apresentarem menor afinidade pelas moléculas de água, as FTases são consideradas enzimas que apresentam baixa atividade hidrolítica (A_h), o que as tornam biocatalisadores potencialmente aplicáveis à produção de FOS (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

Ressalta-se que a razão entre as atividades de transfrutosilação e hidrolítica (A_t/A_h) pode ser considerada como o critério mais importante para se avaliar a produção de FOS a partir de enzimas microbianas (HIDAKA *et al.*, 1988; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007). Quanto maior o valor da razão, mais elevadas são as atividades de transfrutosilação exibidas pelas enzimas, permitindo altas conversões de sacarose em FOS (KIM *et al.*, 1996; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2007; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007).

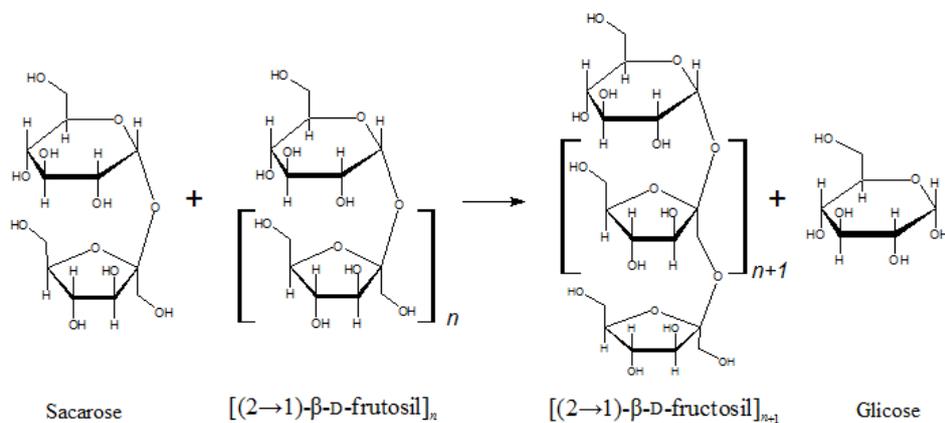


Figura 2 – Reação enzimática de transfrutossilacção (CUNHA, 2017).

Atualmente, é de grande interesse industrial a utilização de cepas microbianas produtoras de FTase com elevada atividade de transfrutossilacção e baixa atividade hidrolítica, afim de se obter altos rendimentos de FOS (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; HIDAKA *et al.*, 1988; HIDAKA *et al.*, 1986). Especificamente, a FTase produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresenta elevadas atividades de transfrutossilacção quando soluções concentradas de sacarose são utilizadas como substrato, o que acarreta, conseqüentemente, a elevada produção de FOS (PERNA *et al.*, 2018; OTTONI *et al.*, 2012; MAIORANO *et al.*, 2009; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007). Apesar do seu excelente desempenho, não há estudos reportados na literatura que visem avaliar a influência da temperatura e pH do meio reacional nas atividades de FTase produzidas especificamente por este micro-organismo. Diante disso, o presente trabalho centrou-se na produção, em escala laboratorial, de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa utilizando meio de cultura sintético e nos estudos de caracterização bioquímica da enzima por meio da avaliação dos efeitos do pH e da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção de frutossiltransferase microbiana extracelular

2.1.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A enzima FTase extracelular foi produzida a partir da cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). Para isso, um pellet contendo aproximadamente 5 g de esporos liofilizados do micro-organismo foi ressuspenso em 10 mL de água destilada estéril, e alíquotas de 70 μ L foram inoculadas em meio sólido contendo (em %, m/v): ágar batata dextrose 2,0, glicerina 2,5, extrato de levedura 0,5 e glicose 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 $^{\circ}$ C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D., os esporos produzidos foram coletados por

meio de raspagem utilizando alça de Drigalski e aproximadamente 10 mL de solução constituída por NaCl 0,95 % (m/v) e Tween-80 0,1 % (v/v). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina 20,0 % (m/v), cujo volume foi variável, de modo ajustar a concentração de esporos para aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer, seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C.

2.1.2 Composição do meio de cultura sintético

O meio de cultura utilizado para a fermentação e crescimento microbiano foi constituído por (em %, m/v): sacarose 15,0, extrato de levedura 0,5, NaNO₃ 0,5, KH₂PO₄ 0,2, MgSO₄.7H₂O 0,05, MnCl₂.4H₂O 0,03 e FeSO₄.7H₂O 0,001 em pH 5,5. Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 120 °C e 2,022 atm durante 15 min.

2.1.3 Construção da curva de crescimento microbiana

Foram inoculados 500 µL de suspensão de esporos, contendo aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹, no meio de cultura descrito no tópico 2.1.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker a 30 °C e 200 rpm durante 76 h, com coleta de amostras em intervalos de tempo pré-determinados. O conteúdo total do frasco foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. A biomassa retida no papel (torta) foi lavada abundantemente com água destilada e seca em estufa por 24 h a 55 °C. A concentração de biomassa foi obtida por meio de massa celular seca por volume (g.L⁻¹). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.1.4 Processo fermentativo

Foram inoculados 0,5 mL de suspensão de esporos (aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹) em 50 mL de meio de cultura, conforme descrito no tópico 2.1.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker a 30 °C e 200 rpm com coleta de pontos a cada 8 h para o monitoramento das atividades hidrolítica e de transfrutossilção, totalizando 72 h de processo. O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. O caldo fermentado (permeado) foi armazenado em tubos para posteriores ensaios de caracterização bioquímica da enzima em relação a temperatura e pH do meio reacional.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Determinação das atividades hidrolítica e de transfrutossilção

Para a determinação das atividades enzimáticas foi definida uma unidade de atividade de transfrutossilção como a quantidade de enzima que produz um micromol

(1 μmol) de FOS por minuto sob as condições ensaiadas. Também, definiu-se uma unidade de atividade hidrolítica como a quantidade de enzima que libera um micromol (1 μmol) de frutose por minuto sob as condições reacionais do ensaio (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; GANAIE; GUPTA, 2014; OTTONI *et al.*, 2012).

Em um tubo foram adicionados 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6% (m/v). Tal mistura foi previamente aquecida durante 10 min a 50 °C até atingir o equilíbrio térmico (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; OTTONI *et al.*, 2012;). A seguir, foi iniciada a reação enzimática ao se adicionar 0,1 mL de caldo fermentado contendo FTase extracelular. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 190 rpm, a 50 °C e por 60 min e, posteriormente, interrompida por banho de água fervente durante 10 min, seguida por banho de gelo (OTTONI *et al.*, 2012; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007).

As atividades enzimáticas de transfrutossilação (A_t) e hidrolítica (A_h) foram calculadas pelas Equações (1) e (2), respectivamente.

$$A_t = \frac{[FOS].V_R}{t_r.V_{enzimático}} \quad (1)$$

$$A_h = \frac{[F].V_R}{t_r.V_{enzimático}} \quad (2)$$

em que [FOS] e [F] são as concentrações de frutooligossacarídeos ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) e frutose ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), respectivamente, V_R o volume do meio reacional (L), t_r é o tempo de reação (min) e $V_{enzimático}$ o volume do caldo fermentado (solução enzimática) (mL).

Os valores de [F] e [FOS], obtidos durante a reação enzimática, foram calculados pelas Equações (3) e (4), respectivamente.

$$[F] = [ART] - [G] \quad (3)$$

$$[FOS] = [G] - [F] \quad (4)$$

em que [ART] e [G] são as concentrações de açúcares redutores totais e glicose, respectivamente, expressas em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

2.2.2 Determinação da concentração de açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores totais (ART) presentes no meio reacional foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959) (MALDONADI *et al.*, 2013; SANTOS-MORIANO *et al.*, 2015).

Primeiramente, foi preparada uma solução de DNS (Reagente A), constituída por 13,98 g.L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH), 5,86 g.L⁻¹ de metabisulfito de sódio (Na₂S₂O₅), 5,37 mL/L de fenol fundido a 50 °C (C₆H₅OH) e 7,48 g.L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇). A solução antioxidante (Reagente B) foi composta por 15,1 g.L⁻¹ de tartarato

duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

A quantificação dos ART foi realizada pela adição, em tudo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL de Reagente A sob agitação vigorosa. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 5 min e interrompida, por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 16 mL de Reagente B. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas por espectrofotometria a 540 nm visando obter as concentrações de açúcares redutores totais (ART).

2.2.3 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método colorimétrico (kit enzimático) GOD-PAP (GANAIÉ; GUPTA, 2014; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011; OLIVEIRA, 2007)

A quantificação de glicose foi realizada pela adição, em tudo de ensaio, de 50 µL da amostra oriunda da reação enzimática, em 5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 37 °C por 5 min ou a temperatura de 15-25 °C por 25 min.

Acoloração final foi estável por 30 min. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas por espectrofotometria a 505 nm, visando obter as concentrações de glicose (G).

2.3 Caracterização bioquímica da enzima extracelular

Uma vez definido o melhor tempo de fermentação em que foram produzidas FTases extracelulares com mínima e máxima atividades hidrolítica e de transfrutossilação, respectivamente, foi utilizado o caldo fermentado (solução enzimática) coletado neste tempo de processo para a realização dos ensaios de caracterização bioquímica da enzima microbiana. Posteriormente, foram avaliados os efeitos da temperatura e do pH do meio reacional nas atividades enzimáticas.

2.3.1 Avaliação dos efeitos da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilação

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos em meio reacional constituído por 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6 % (m/v). Foram avaliadas as temperaturas de reação (30 °C ≤ T ≤ 65 °C, com Δ = 5 °C) e as atividades foram determinadas conforme método descrito no tópico 2.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.2 Avaliação dos efeitos do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção

Os ensaios de atividade foram conduzidos em meio reacional constituído por 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ (3,0 ≤ pH ≤ 6,5, com Δ = 0,5) e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6% (m/v) a 50 °C. As atividades hidrolítica e de transfrutossilacção foram determinadas conforme método descrito no tópico 2.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de crescimento microbiana

A Figura 3 apresenta a curva de crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* IPT 301 em função do tempo de fermentação. Foi possível identificar a fase lag de crescimento durante as primeiras 8 h do processo seguida da fase log até as 48 h, em que se constatou um pico de concentração de biomassa igual a 9,35 ± 1,26 g.L⁻¹. Após 56 h de fermentação, foi observado a fase estacionária para a curva de crescimento que se estendeu até o término do processo, cuja concentração de biomassa obtida foi de 7,51 ± 1,57 g.L⁻¹. Pelo perfil da curva de crescimento não se pode afirmar que a fase de declínio ou morte celular foi atingida, uma vez que as concentrações de biomassa permaneceram constantes a partir de 56 h de fermentação.

O valor máximo obtido para a concentração de biomassa de *A. oryzae* mostrou-se aproximadamente 2,0 vezes maior que o reportado por Ottoni et al. (2012) em que, utilizando um meio de cultura com composições similares, obteve uma concentração de 4,85 g.L⁻¹ de micélio. Cuervo-Fernandez et al. (2007), sob as mesmas condições experimentais, produziu 7,39 ± 1,10 g.L⁻¹ de biomassa de *A. oryzae* IPT-301, ou seja, um valor 21,0 % menor ao obtido neste trabalho.

Ressalta-se ainda que Ottoni et al. (2012), reportaram uma concentração de biomassa de 10,46 g.L⁻¹ (12,0 % maior que a concentração de biomassa produzida neste trabalho), ao realizar a fermentação em meio de cultura otimizado, composto majoritariamente por 320,5 g.L⁻¹ de sacarose, 7,13 g.L⁻¹ de ureia e 2,11 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

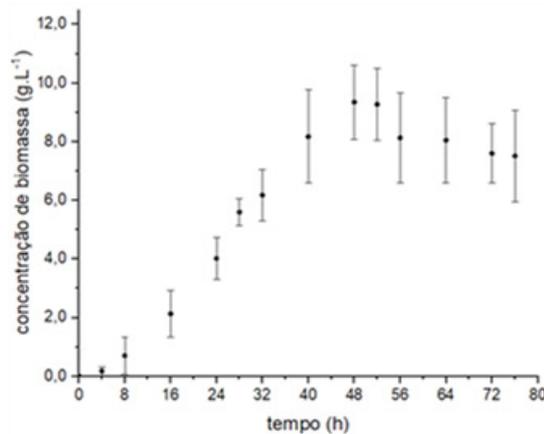


Figura 3. Concentração da biomassa celular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em função do tempo de fermentação a 30°C.

O fato da atividade enzimática da FTase estar intimamente ligada a quantidade de biomassa produzida durante a fermentação, permite sugerir, *a priori*, a utilização de tempo de fermentação de até 52 horas, já que se tem maior quantidade de enzima presente no caldo fermentado. Demais estudos foram realizados por outros autores visando atestar esta afirmação, visto que a atividade enzimática depende de diversos fatores, como o pH do meio fermentado, temperatura, pH do meio reacional da atividade enzimática e concentração de substrato (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

No presente trabalho, a progressão do pH do caldo fermentado para o *Aspergillus oryzae* IPT-301, em que o pH inicial foi de 5,50, mostrou a acidificação do meio de cultura, com valor final de pH igual a 4,82. Os estudos de Cuervo-Fernandez *et al.* (2007) mostraram que os caldos de fermentação produzidos pelas cepas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e *Aspergillus niger* ATCC 20611, IPT-608 e IPT-615 apresentaram valores finais de pH iguais 5,70, 4,21, 5,43 e 5,53, respectivamente. Segundo Maiorano *et al.* (2009), a produção máxima de FTase, utilizando *Aspergillus oryzae* IPT-301 como fonte produtora da enzima, encontra-se na faixa entre 4,5 a 5,0, ao passo que, a produção máxima de biomassa foi verificada para caldos fermentados com pH 5,0. O *A. oryzae* é produtor de proteases ácidas, responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas e liberação de aminoácidos, o que ocasiona a acidificação do meio de cultura, interferindo também nas atividades enzimáticas (CASTRO; SATO, 2014; TSUJITA *et al.*, 1997).

3.2 Influência do tempo de fermentação nas atividades de transfrutossilção e hidrolítica

A Figura 4 apresenta as atividades de transfrutossilção e hidrolítica extracelulares em função do tempo de fermentação. Foi observado um pico de produção da enzima FTase para 64 h de processo ($19,76 \pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$). Por outro lado, obteve-se uma baixa atividade hidrolítica ($1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$). Portanto, para o mesmo período, foi obtido uma razão A_f/A_h igual a $12,22 \pm 1,82$ entre as atividades avaliadas, indicando maior produção de FOS durante o processo fermentativo, já que elevados valores

desta razão indicam predominância da atividade de transfrutoseilação frente à hidrolítica (HIDAKA, 1988; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007). Esta elevada razão entre as atividades torna-se um fator positivo ao se considerar o uso industrial da enzima (HERNALSTEENS, 2006; OLIVEIRA, 2007).

Cuervo-Fernandez et al. (2007), utilizando o *A. oryzae* IPT-301 e meio de cultura similar ao do presente trabalho, obtiveram a máxima produção da enzima em 72 h de fermentação. Foram obtidos valores de atividades hidrolítica e de transfrutoseilação iguais a 3,44 U.mL⁻¹ e 17,90 U.mL⁻¹, respectivamente, correspondendo a uma razão At/Ah entre as atividades de 5,2. No entanto, neste trabalho, durante 72 h de processo, a atividade de transfrutoseilação obtida (10,82 ± 2,26 U.mL⁻¹) foi relativamente menor do que a atividade de transfrutoseilação obtida em 64 h de fermentação, resultando numa razão At/Ah de 3,3 ± 1,96. A diminuição da atividade de transfrutoseilação é atribuída a produção concomitante de proteases ácidas pelo *A. oryzae* IPT-301 (CASTRO; SATO, 2014; TSUJITA et al., 1997). Diante desses resultados, definiu-se 64 h como o tempo de processo favorável para a produção da FTases utilizando o *Aspergillus oryzae* IPT 301 como micro-organismo produtor em meio de cultura sintético, sendo este período utilizado como tempo de fermentação padrão para a avaliação da influência da temperatura e do pH nas atividades enzimáticas.

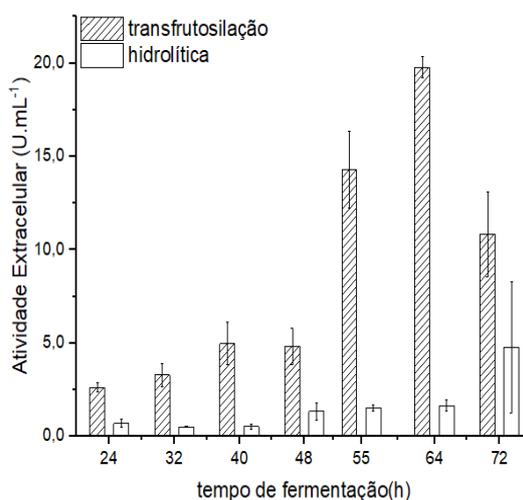


Figura 4. Atividades de transfrutoseilação (A_t) e hidrolítica (A_h) da FTase extracelular, em função do tempo de fermentação, em solução de sacarose 63,6 % (m/v) a 50 °C e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5.

3.3 Influência da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutoseilação

A influência da temperatura nas atividades enzimáticas é apresentada na Figura 5. A FTase extracelular exibiu atividades máxima (19,53 ± 0,056 U.mL⁻¹) e mínima (1,65 ± 0,031 U.mL⁻¹) de transfrutoseilação e hidrolítica, respectivamente, para a temperatura de 50 °C. Para as temperaturas de 30 °C e 35 °C houve o predomínio da atividade

hidrolítica, resultado este também observado para as temperaturas de 60 °C e 65 °C, em que ocorreu uma queda na atividade de transfrutoseilação e aumento significativo da atividade hidrolítica, resultando em uma possível na hidrólise enzimática das moléculas de sacarose, conforme reportado por Almeida *et al.* (2005) em estudos utilizando FTases produzida por *Cladosporium cladosporioides*.

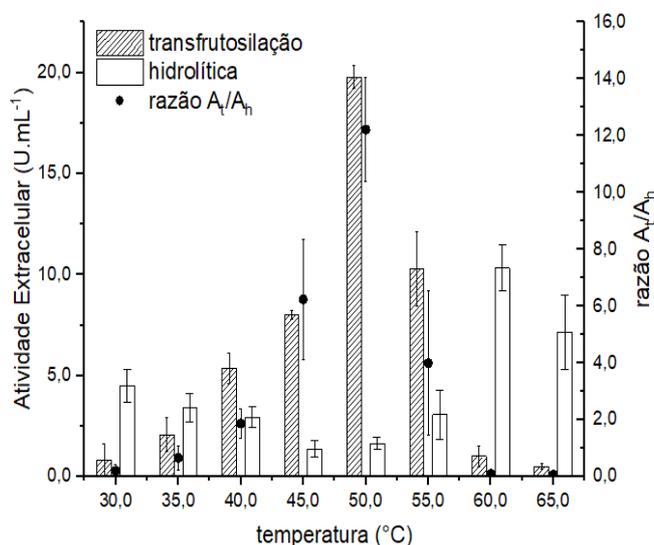


Figura 5. Influência da temperatura nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutoseilação (A_t) da FTase extracelular em solução de sacarose 63,6 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5.

Similarmente, Yun (1996) e Hayashi *et al.* (1990) indicaram que a faixa ótima de temperatura para a enzima produzida por *Aureobasidium pullulans* e *Aureobasidium* sp., respectivamente, manteve-se entre 45 e 55 °C. Maiorano *et al.* (2009) e Madlová *et al.* (2000) obtiveram uma faixa de temperatura ótima para a atividade de transfrutoseilação compreendida entre 50 °C a 60 °C para FTases produzidas a partir de *A. oryzae* e *Aureobasidium pullulans*. Também Hayashi *et al.* (1990) obtiveram altas atividades de transfrutoseilação a 50 °C para a enzima produzida por *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. Em temperaturas fora dessa faixa, as razões são irrelevantes, não sendo recomendado o uso de FTase extracelular. A razão máxima obtida foi de $12,22 \pm 1,81$, isto é, aproximadamente 2,4 vezes maior ao valor da razão obtido por Cuervo-Fernandez *et al.* (2007) nas mesmas condições experimentais utilizando o *A. oryzae* IPT-301 como micro-organismo produtor de FTases.

3.4 Influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de de transfrutoseilação

A influência do pH do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutoseilação das FTases extracelulares é apresentada na Figura 6. Nota-se que, para valores de pH relativamente baixos (meios reacionais muito ácidos), as atividades hidrolíticas são predominantes.

Contudo, para pH variando entre 4,5 e 6,0, as atividades de transfrutoseilação e hidrolítica mostraram-se estáveis com valores de 18,00 U.mL⁻¹ e 1,30 U.mL⁻¹, respectivamente, caracterizando, portanto, a faixa de pH em que a enzima apresentou máxima atividade, ocorrendo decréscimo nos valores de atividade de transfrutoseilação e aumento da atividade hidrolítica em pH 6,5. Faixas iguais de pH para a atividade da FTase extracelular foram reportadas nos trabalhos de Maiorano *et al.* (2008), Cuervo-Fernandez *et al.* (2007), Sangeetha *et al.* (2005), Katapodis *et al.* (2004) e Hayashi *et al.* (1990).

Oliveira (2007) reportou em seus estudos a ocorrência de hidrólise ácida das moléculas de sacarose em pH inferior a 4,0, tanto para FTases livres ou imobilizadas, inferindo, portanto, na baixa produção de FOS para esta faixa de pH. A ocorrência de hidrólise ácida da molécula de sacarose conjuntamente com a atividade hidrolítica elevada acarretam, possivelmente, a diminuição da razão entre as atividades da FTase extracelular na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 4,0.

Nota-se que na faixa de pH compreendida entre 4,5 a 6,0, a razão entre as atividades manteve-se aproximadamente constante, com valor de $13,71 \pm 1,26$, indicando a predominância da atividade de transfrutoseilação. Os estudos de Maiorano *et al.* (2008) reportam que a faixa ótima de pH para a FTase oriunda de *Aspergillus oryzae*, compreendeu-se entre 5,0 e 7,0. Outros trabalhos, como de Ganaie *et al.* (2014) e Kurakake (1996), verificam que a enzima, também produzida por *Aspergillus oryzae*, apresentou valores elevados de atividades de transfrutoseilação para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 a 7,0, com pico de atividade em pH 6,0. FTases produzidas por outros micro-organismos possuem faixa ótima de pH próximas aos reportados neste trabalho, como por exemplo as oriundas de *Lactobacillus reuteri* (pH entre 5,0 e 5,5) e *Lactobacillus johnsonii* (pH entre 4,5 e 6,0) (ANWAR *et al.*, 2008; VAN HIJUM *et al.*, 2003).

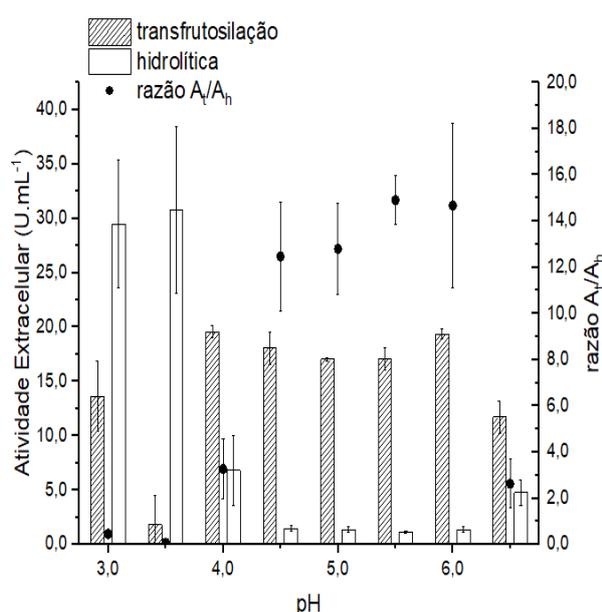


Figura 6. Influência do pH nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutoseilação (A_t) da FTase extracelular em solução de sacarose 63,6 % (m/v) a 50 °C e solução tampão tris acetato 0,2 mol.L⁻¹.

4 | CONCLUSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa, pode-se concluir que a produção, em escala laboratorial, de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa foi bem-sucedida, pois ao decorrer do processo foi possível obter valores satisfatórios para as atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da enzima e monitorar o crescimento do fungo por meio da construção da sua curva de crescimento ao longo do processo fermentativo. Verificou-se que em 64 h de fermentação, foram produzidas FTases com as maiores atividades de transfrutossilacção ($19,76 \pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$) e menores atividades hidrolíticas ($1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$), resultando numa razão entre atividades (A_t/A_h) igual a $12,22 \pm 1,82$. Com relação aos estudos de caracterização bioquímica, a enzima exibiu máxima atividade de transfrutossilacção e mínima atividade hidrolítica no meio reacional para uma faixa de pH de 4,5-6,0 e temperatura de 50 °C. Portanto, os resultados obtidos atestaram que o fungo se destacou como fonte produtora de FTases extracelulares e estas, por sua vez, mostraram-se promissoras para a síntese de FOS em escala laboratorial.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA A. C. S. et al. **Sucrose hydrolysis catalyzed by autoimmobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides***. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 8.,2005.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. **Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides**. *Chemical Papers—Chemické Zvesti*, v. 55, p. 350–358, 2001.
- ANTOŠOVÁ, M. et al. **Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans***. *Journal of Biotechnology*, v. 135, p. 58–63. 2008.
- ANWAR, M.A. et al. **The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme**. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74 p. 3426-3433, 2008.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. **Protease form *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolases with antioxidant activities**. *Journal of Food Processing*, v. 2014, 2014.
- CHAPLIN, M; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- CHEN, C. et al. **Cloning, expression and functional validation of a β -fructofuranosidase from *Lactobacillus plantarum***. *Process Biochemistry*, v.49. p. 758-767, 2014.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. **Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus***. *Enzyme and Microbial Technology*,v. 18. P 153-160, 1996.
- CHIEN, C.S; LEE,W.C; LIN, T.J. **Immobilization of *A. japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides**. *Enzyme Microbiology Technology*, v.29. p.252-257, 2001.
- CUERVO-FERNANDEZ, R. et al. **Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus sp.* 27H**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.79, p.268-272, 2004.
- CUERVO-FERNANDEZ, R. et al. **Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate**. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

v.74, p.87-93, 2007.

CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* ipt-301 visando a obtenção de fructooligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

DÍAZ, C.J.A.; GUTIERREZ, A.M.; BAHAMON, I.; RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.A.; SÁNCHEZ, O.F. **Computational analysis of the fructosyltransferase enzyme in plants, fungi and bacteria**. *Gene*, 484, 26 (2011).

DOMINGUES, A. L. **An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications**. *Food Bioprocess and Technology*, v. 7, n. 324, 2014.

GANAI, M.A.; LATEEF, A.; GUPTA, U.S. **Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms**. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.172, p. 2143-2159, 2014.

GANAI, M.A.; GUPTA, U.S. **Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides**. *Carbohydrate Polymers*, v.110. p. 253-258, 2014.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotics**. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401 (1995).

GUPTA, A.K.; BHATIA, I.S. **Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum* regulation and substrate specificity of fructosyltransferase and invertase**. *Phytochemistry*, 21, 1249 (1982).

HAYASHI, S. et al. **Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium sp.* ATCC 20524**. *Journal of Industrial Microbiology*, v.5, p.395-400, 1990.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 184 f. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HIDAKA, H. **Fructooligosaccharides**. In: The amylase research Society of Japan (ed) *Handbook of amylases and related enzymes*. Pergamon, 1988.

HIDAKA, H., HIRAYAMA, M.; SUMI, N. **A fructooligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611**. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 52. p.1181–1187, 1988.

HIDAKA, H. et al. **Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health**. *Bifidobacteria Microflora*, v.5 p.37–50. 1986.

HIRAYAMA, M.; NISHIZAWA, K.; HIDAKA, H. **Production and Characteristics of Fructooligosaccharides**. In: A. Fuchs (Eds.), *Inulin and Inulin-containing Crops*, Elsevier Science, Wageningen, 1993.

KATAPODIS, P. et al. **Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 378–382, 2004.

KIM, M.H.; IN, M.J.; CHA, H.J.; YOO, Y.J. **An empirical rate equation for the fructooligosaccharide-producing reaction catalyzed by β -fructofuranosidase**. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 458 (1996).

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. **Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae***. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 45, p. 236-239, 1996.

LATEEF, A.; OLOKE, J.K.; PRAPULLA, S.G. **The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.

40, p.1067–1070, 2007.

LEE, J.H.; SHINOHARA, S. **Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructooligosaccharides from Sucrose Using *Penicillium citrinum* Cells.** The Journal of Microbiology, v.39, n.4, p.331–333, 2001.

LIM, J.S.; PARK, M.C.; LEE, J.H.; PARK, S.W.; KIM, S.W. **Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*.** European Food Research and Technology, 221, 639 (2005).

L'HOCINE, L. et al. **Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023.** Journal of Biotechnology, v.81,n. 1, p.73-84, 2000.

MADLOVÁ, A. et al. **Thermal stability of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*.** Chemical Papers, v.54, p.339-344, 2000.

MAIORANO, A.E. et al. **Influence of the culture medium on the fructosyltransferase production.** New Biotechnology, v. 25 S, p. 201, 2009.

MAIORANO, A.E. et al. **Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics.** Biotechnology Letters, v.30. p.1867-1877, 2008.

MALDONADI, I.R; CARVALHO, P.G.B; FERREIRA, N.A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS.** Brasília: EMBRAPA, 2013.

MÁRQUEZ, D.B.M.; CONTRERAS, J.C.; RODRÍGUEZ, R.; MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A.; AGUILAR, C.N. **Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in solid-state fermentation using aguamiel as culture medium.** Bioresource Technology, 213, 276 (2016).

MILLER, G.L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry, v.31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOORE, N.C.C.; YANG, L.P.; STORM, H.; OLIVA-HEMKER, M.; SAAVEDRA, J.M. **Effects of fructooligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial.** British Journal of Nutrition, 90, 581 (2003).

MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A. **Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source.** Biochemical Engineering Journal, 53, 154 (2010).

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligosaccharídeos.** 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.

OTTONI, C. A. et al. **Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, ed. 1, p.49-59, 2012.

PATEL, V.; SAUNDERS, G.; BUCKE, C. **Production of fructooligosaccharides by *Fusarium oxysporum*.** Biotechnology Letters, 16, 1139 (1994).

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. **Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities.** International Journal of Engineering Research & Science, vol 4, Issue-3, 2018.

ROBERFROID, M.B. **Prebiotics: the concept revisited.** Journal of Nutrition, v.137 (sup 3), p.S 830-837, 2007.

ROMANO, N.; SANTOS, M.; MOBILI, P.; VEGA, R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. **Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-**

- oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis.** Food Chemistry, 202, 467 (2016).
- SÁNCHEZ, O.; GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. **Fructooligosaccharides production by *Aspergillus sp. N74* in a mechanically agitated airlift reactor.** Food and Bioprocess Processing, 86, 109 (2008).
- SANGEETHA, P.T. et al. **Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202.** Process Biochemistry, v.40 p.1085–1088, 2005.
- SANTOS-MORIANO, P. et al. **Levan versus fructooligosaccharide synthesis using levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions.** Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, n.119, p. 18-25, 2015.
- SHULER, M.L. **Bioprocess engineering: basic concepts.** 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.
- TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. **Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat.** Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 32, 111 (1986).
- USAMI, S.; ISHII, T.; KIRIMURA, K.; UEHARA, K.; CHEN, J. **Production of β -fructofuranosidase showing fructose-transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P. glabrum*).** Journal of Fermentation and Bioengineering, 72, 303 (1991).
- VAN HIJUM, S.A.; VAN DER MAAREL, M.J.; DIJKHUIZEN, L. **Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121.** FEBS Letters, v.534. p.207-210, 2003.
- VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. **Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology.** Bioresource Technology, v.102, p.10180–10186, 2011.
- WANG, L.M.; ZHOU, H.M. **Isolation and identification of a novel *A. japonicus* JN19 producing β -fructofuranosidase and characterization of the enzyme.** Journal of Food Biochemistry, 30, 641 (2006).
- WONG, C.M.; WONG, K.H.; CHEN, X.D. **Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 78, n. 6, p. 927-938, 2008.
- YUN, J. W. **Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and application.** Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p.107-117, 1996.
- YUN, J.W. et al. **Semi-batch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*.** Applied Biochemistry and Biotechnology. v.24/25, p. 299–308, 1990.
- ZENG, X.A.; ZHOU, K.; LIU, D.M.; BRENNAN, C.S.; BRENNAN, M.; ZHOU, J.S.; YU, S.J. **Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as catalyst for bio-transformation.** Food Science and Technology, 65, 1072 (2016).

ENZYMATIC COCKTAIL PRODUCED BY *Fusarium sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT CRUDE CASSAVA STARCH (*Manihot esculenta Crantz*).

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira

Federal Institute of Amapá - IFAP / Federal University of Para-UFPA, Network Bionorte
Belém – Pará

Elaine Cristina Souza Medeiros

Federal University of Pará, UFPA, Institute of Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

Rubens Menezes Gobira

Federal University of Para-UFPA, Network Bionorte
Belém - Pará

Ricardo Felipe Alexandre de Mello

Federal University of Pará, UFPA, Institute of Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

Alberdan Silva Santos

Federal University of Pará, UFPA, Institute of Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

ABSTRACT: With the advancement of microorganism cultivation and the induction of enzyme production, the use of filamentous fungi has become strategic as a source of hydrolase and, especially, the specific selection of strains that produce amylolytic systems capable of composing enzymatic cocktails. It has been the subject of studying in our group in recent years. The objective of this work is the

production of amylolytic concentrates (amylase, glucoamylase, amylopectin) from *Fusarium sp.* for the deconstruction of cassava starch (*Manihot esculenta Crantz*), without the addition of other enzymes. The applied methodology has involved the adaptation of the microorganisms in the natural substrate, and the results showed high amylolytic activity in solid and submerged culture medium. The enzymatic cocktail hydrolyzed the cassava starch with a yield of 83% w/w in 10 minutes and reached 96.90% in 120 minutes of incubation.

KEYWORDS: Filamentous fungus. Starch. Enzyme.

1 | INTRODUCTION

Countries located in tropical regions, such as Brazil, have a great advantage in relation to the main starch producers in the world, which are located in temperate regions due to the variety of tropical crops (Scipione, 2011). Cassava root (*Manihot esculenta*, Crantz) is a raw material rich in the starch of easy extraction, being cultivated in almost all Brazilian territory. The amylases are among the first known enzymes. They promote the hydrolysis of starch to reducing sugars, being detected for more than a century in a great variety of biological materials. These enzymes are termed amylolytic

because they promote starch degradation, were described in 1811 in wheat extracts; In 1831 in saliva; In 1833 in malt; In 1846 in the blood; And in 1881 produced by the fungus *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982). Although amylases can be derived from a variety of sources, including plants, animals, and microorganisms, microbial enzymes generally meet high industrial demand. Hydrolyzed products are widely used in food, paper, and textile industries and currently in the production of biofuels.

2 | METHODOLOGIES

2.1 Micro-organism

The micro-organism used was the *Fusarium* sp, isolated from cassava roots collected in the area of settlement of family farmers, located on the shores of Highway 391 PA, Km 18 (1° S and 48° 08 ' 22 "W, altitude 14 m) in the District of Mosqueiro, in Parramatta. Microorganisms were isolated in the Middle APY (yeast extract 2.5 g/L, 2.5 g/L peptone, cassava starch 10 g/L agar 10 g/L and pH adjusted to 5) and deposited on mycology collection of the LabSisbio.

2.2 Solid Cultivation of the micro-organism

The experiment was accomplished in seven Petri dishes, six of them containing 20 l of sterile medium APY and one with 20 mL GPY (10 g/L glucose, 2.5 g/L peptone, yeast extract 2.5 g/L Agar 10 g/L). The micro-organism was blown out in each of the seven plates and incubated in an oven at 30° C for 5 days. (GONÇALVES, 2006)

2.3 Measures of diameter growth

The measure of the growth of the colony and the halo were two strokes perpendicular axis, dividing the colonies into approximately equal quadrants, enabling two measures of diameter per plate used. The diameter of the colonies was measured every 24 hours over 5 consecutive days. (OLIVEIRA, 2006)

2.4 Measures of the diameters of the halos

The plates with the Middle APY were "revealed" through a lugol's solution (Iodine 0.3% m/v and potassium iodide 1% m/v), one every 12:00 am for five days. We used approximately 15 mL lugol's iodine on each plate, leaving for 5 minutes and then measures. (OLIVEIRA, 2006)

2.5 Cultivation in liquid medium

The microorganism was used for culture in a liquid medium and later analysis of the presence of amylolytic activity in the culture supernatant. They were cultured in

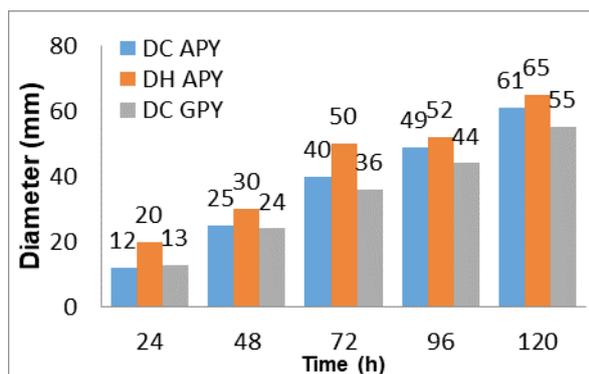
APY liquid medium without the addition of agar. In 1 L conical flasks containing 500 ml of culture medium, autoclaved at 121 ° C for 15 minutes, cooled to room temperature and inoculated with 4 discs from the colony of the microorganism, and incubated on an orbital shaker at 30 ° C at 130 rpm. Samples (2 mL) were removed every 24 hours and centrifuged (3600 rpm for 5 minutes). The supernatant medium was used to determine the respective enzymatic activity.

2.6 Degradation of cassava starch

Cassava starch degradation was determined through the dosage of starch degraded. Added 200 μ L enzyme broth, and 600 μ L of hydrated starch solution (0,2g of soluble starch in 100 mL of acetate buffer pH 5, heated to 100°C for 5 minute), incubated the 37°C, 300 rpm on the dry-in dry- bath, added 200 μ L of 1 N HCl and 1000 μ L of lugol (Iodine 0.3% m/v and potassium iodide 1% m/v), followed by vortex shaking at 37 ° C for 5 minutes and reading at 580 nm in the UV-vis spectrophotometer.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Solid amylolytic activity was determined by the correlation between the halo size and the degradative capacity of the microorganism. The presence of the halo indicates that the fungus is capable of producing amylolytic enzymes, hydrolyzing the starch in the medium. After five days of the experiment, it was verified that the microorganism is adapted to the medium in which it was isolated, presenting a larger diameter of growth in APY medium when compared to GPY (graph 01).



Graph 01 - Growth diameter (DC) and halo diameter (HD) of the microorganism in solid medium.

The statistical data (graph 01) can also be visually verified when compared to the images of the sizes of halos formed (figure 01).

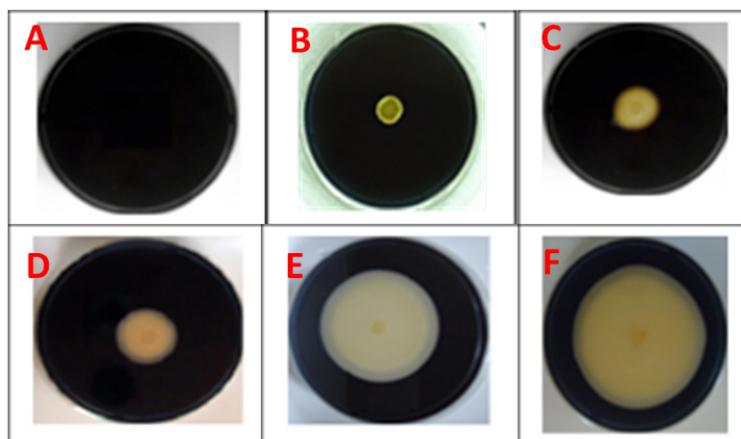
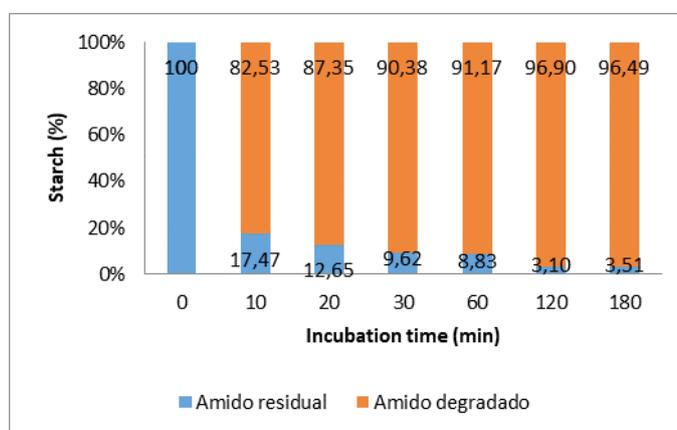


Figure 01- halo formation on plates stained with Lugol's solution. **A:** time 0h; **B:** time 24h; **C:** time 48 h; **D:** time 72h; **E:** time 96h; **F:** time 120h

Graph 02 represents amount (%) of residual starch and degradation of cassava root as a function of incubation time (min). It can be observed that in the first 10 minutes of incubation, 82.53% of the hydrolysis was obtained and after 120 minutes a percentage of 96.90% of degraded starch was reached, while the percentage of residual starch was of 3.10%. The increase of the residual starch in the time of 180 min may be related to the denaturation of the enzymes, caused by the interaction with other components of the medium, protease action or by thermal denaturation when kept at 50 ° C for several hours.



Graph 2 - Degradation of cassava starch as a function of incubation time (min).

4 | CONCLUSIONS

Through the results obtained by the experiments, it was possible to conclude that the microorganism proved to be a good producer of amylases in a solid medium in view of the size of the formed halo in relation to the growth diameter in the presence. The hydrolysis of the starch suggests that the microorganism is capable of secreting amylolytic enzymes which promote the degradation of the present starch.

REFERENCES

GONÇALVES, A.; Z.; L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyceslanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro. 2006, 65fl.

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

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A. ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. **ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIA NATIVOS DA AMAZÔNIA CENTRAL CRESCENDO EM DIFERENTES NÍVEIS DE ACIDEZ.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(1): 204-210, 2006.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*SolanumTuberosaum* L.) utilizando enzimas amilolíticas.** Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2011, 95fl.

THE SYSTEMATIC INVESTIGATION OF L-ASPARAGINASE PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI

Eliane Silva e Silva

Federal University of Pará, Institute of Exact and Natural Sciences - Laboratory of Systematic Investigation in Biotechnology and Molecular Biodiversity. Belém-Pará
Hematology and Hemotherapy Foundation of Pará. Belém-Pará

Alberdan Silva Santos

Federal University of Pará, Institute of Exact and Natural Sciences - Laboratory of Systematic Investigation in Biotechnology and Molecular Biodiversity. Belém-Pará-Brazil.

Márcia Gleice da Silva Souza

Federal University of Pará, Institute of Exact and Natural Sciences - Laboratory of Systematic Investigation in Biotechnology and Molecular Biodiversity. Belém-Pará

Rubens Menezes Gobira

Program in Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon
Belém-Pará

Maria Inez de Moura Sarquis

Culture Collection of of Filamentous Fungi,
Oswaldo Cruz Institute – FIOCRUZ
Rio de Janeiro-RJ

most commonly used L-asparaginase against leukemia comes from bacteria. However, L-asparaginase from bacteria can cause hypersensitivity in the long-term use, leading to allergic reactions and anaphylaxis. For this reason, in the last five years our group has been engaged in discovering L-asparaginase producing eukaryotic microorganisms, in order to obtain an enzyme that possibly causes less adverse effects in humans. To this end it has been used a simple and rapid assay method for the detection of L-asparaginase production from different filamentous fungi using phenol red as a detector of the activity for this enzyme by the formation of a pink zone in solid medium, at different pH and temperature conditions. In the present study, 10 fungi strains were analyzed, and 5 were selected and identified as L-asparaginase producers. The best producer strains were *Peacilomyces variotii*, showing activity reached 17.8 U/mL after 48h at 33 °C under experimental conditions.

KEYWORDS: Asparaginase. Anti-neoplastic. Enzyme. Lymphoblastic leucemia.

ABSTRACT: L-Asparaginase is an anti-neoplastic enzyme agent, used in the treatment of lymphoblastic leukemia. Various microorganisms such as bacteria, fungi, plants, and yeasts are able to produce L-asparaginase. Current, the

1 | INTRODUCTION

Many enzymes are used in the treatment of diverse diseases, such as L-asparaginase (L-asp), an effective therapeutic agent against

Acute Lymphoid Leukemia and other human cancers. Cancer cells differentiate from normal cells in decreased expression of L-asparagine. Thus, they are not capable of producing L-asparagine and depend mainly on the circulating amino acid in plasma. Tumor cells, more specifically lymphatic tumor cells, requires huge amount of asparagine to keep up with their rapid malignant growth. Thus the asparagine from the diet as well as what can be made by themselves (which is limited) is utilized by them to satisfy their large asparagine demand. Therefore L-asparagine is an essential amino acid for the growth of tumor cells. These leukemic cells depend on circulating asparagine for their ample nourishment and diet. Asparaginase, however, catalyzes the conversion of L-asparagine to aspartic acid and ammonia. This deprives the leukemic cell of circulating asparagine and prevents them from the rapid malignant growth (VERMA et al. 2007). This clinical action of the enzyme is attributed to the reduction of L-asparagine, since tumor cells incapable of synthesizing these amino acids suffer apoptosis due to the deprivation of L-asparagine. The enzyme is widely distributed in animal, microbial and plant sources. Clinically used L-asp formulations are prepared from bacterial sources, which have been causing allergic reactions in patients. It has been observed that eukaryotic microorganisms, such as yeasts and fungi, have potential for the production of asparaginase. This paper approaches the production of L-asp from endophytic fungi from Culture Collection of Filamentous Fungi, Oswaldo Cruz Institute – FIOCRUZ, through of semi-solid fermentation. L-asparaginase is an extracellular enzyme that has been used as an important anticancer agent. The commercial enzyme is obtained from *Escherichia coli* and *Erwinia carotova*. Although, L-asparaginase from bacterial can cause hypersensitivity, allergic and anaphylactic reactions in leukemia's patients. Fungi have been reported as potential producers of L-asp compared to bacteria (GRAHAM et al, 2003) and can be an alternative to patients with cancer for perhaps presenting low intensity of allergic reactions. The post-translational properties that occur in fungi and are absent in bacteria may be responsible for this (SARQUIS et al, 2004).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1.1 Microorganism strains

The enzyme L-Asp was routinely screened in culture filtrates by using Nessler's reagent but the procedure is lengthy and time consuming, that's why the use of rapid plate assay for screening L- asparaginase producing microorganisms can be use which is sensitive and rapid procedure that may directly give potential asparaginase activity. the microorganisms used were *Aspergillus tamari* IOC184, *A. terreus*, *A. niger* IOC200, *A. japonicas* MIBA0006, *A. giganteus* IOC2155, *A. oryzae* IOC154, *Phanerochaete chrysosporium* (IOC4165), *Paecilomyces variotii* IOC5191, *Penicillium chysogenium*

2.1.2 Inoculum preparation and L-asparaginase induction

The microorganism strains were grown in plates with Czapek-Doxs semisolid medium (2 % (w/v) KH₂PO₄, 6 % (w/v) asparagine, 1 % (w/v) MgSO₄·7H₂O, 1 % (w/v) CaCl₂·2H₂O, 3 % (w/v) glucose and 1.2 % (w/v) agar) at 28°C for 10 days, pH 7.2. Ten round pieces of micelial agar plate with 5 mm of diameter were added in 250 mL glass conical flask contend 50 ml of the Czapek-Doxs medium, without agar. For induction of the fungi L-asparaginase production, was added 1% of asparagine as substrate-inducer in medium and incubated at 37°C at 120 rpm for 96 h. An aliquot of 1mL from supernatant was withdraw each 24 hours and L-asparaginase activity was quantified (SOUZA, 2013).

2.1.3 The effect of pH and temperature on enzyme activity:

The activity of L-asparaginase was evaluated at different pH and temperature values. The crude enzyme was incubated at 0.05 M buffers with a pH range of 3-11, under the assay conditions, and the amount of liberated ammonia was determined by Nesslerization's method. The Buffers used were potassium phosphate (pH 3.0 - 7.0), Tris-HCl (pH 8.0 - 9.0) and glycine-NaOH (pH 10 - 11). The pre-incubation for the L-asp activity determination was carried out for 30 min. The optimum temperature was selected by incubating the mixture at 27 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C and 40°C. Extracellular L-asparaginase activity was assayed according to the modified method of Imada (1972), using L-asparagine as substrate. 350 µL ml of buffer 0.5 M (pH 3-11), 125 µL of 0.04 M L-asparagine and 25 µL of crude enzyme were all mixed, and incubated at different temperatures for 30 min. The reaction was stoped by the addition of 250 µL of 1.5 M of trichloroacetic acid (TCA). The ammonia liberated was quantified colorimetrically by adding 0.050 mL of Nessler's reagent to the mixture of 12.5 µL filtrated and 937 µL of distilled water was added. The absorbance was recorded at 450 nm with a UVspectrophotometer (Genesis 10 UV). The blank was prepared as above, except that the enzyme was added after the TCA addition. The amount of ammonia liberated by the test sample was calculated using the ammonium sulfate standard curve. One unit of L-asparaginase is defined as the amount of enzyme which liberated 1 mmol of ammonia per min per mL under the assay conditions.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, 10 fungi strains were investigated for the production of the enzyme L-asparaginase using the test method in plate (qualitative method). Of these, only 5 fungi strains - *A. tamaritii*, *A. terreus*, *F. oxysporum*, *P. variotti* and *P. chrysosporium*

- were selected and identified as L-asp producing by the formation of the pink zone in medium containing phenol red (exemplified In Figure 1).

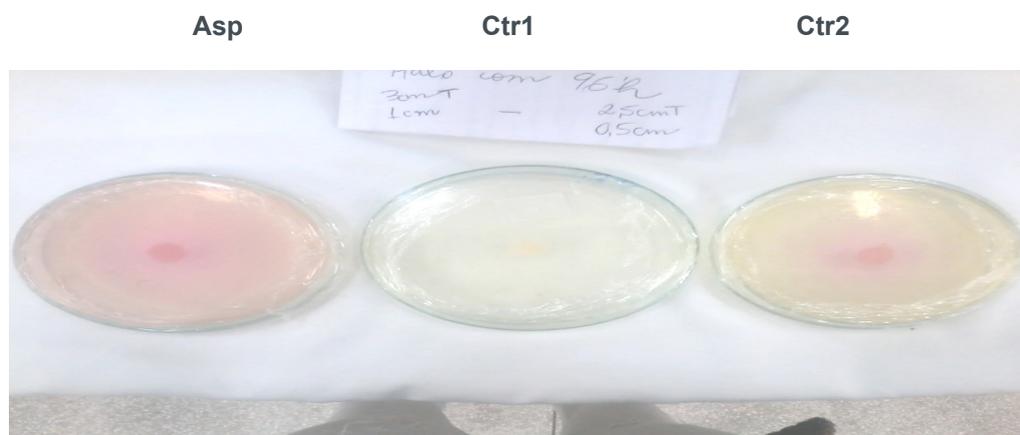


Figure 1. Effect of phenol red (0,005%) by *P. variotii* on Czapek Dox's medium. Asp (substrate 1% Asparagine and phenol red); Ctr1 (Control without phenol red); Ctr2 (Control with phenol red and without Asparagine).

The cultures with positive tests were subjected to quantification of enzymatic activity under pH 9 at 33°C. Among the 5 selected cultures, *P. variotii* presented the highest values reached for the enzyme activity: 17.8 U / mL , (Table 1).

Fungi Strains	Enzyme activity (U/mL)
<i>A. tamaritii</i>	10.4
<i>A. terreus</i>	11.2
<i>F. oxysporum</i>	6.8
<i>P. variotii</i>	17.8
<i>P. chrysosporium</i>	12.7

Table 1. Screening of fungi producers of L-asparaginase Czapek-Dox medium with 48h culture incubation (pH 9.0, 33°C)

In order to investigate the optimum L-asparaginase production temperature by *P. variotii*, a screening of the enzymatic activity under various temperatures at pH 9 was performed. The best temperature for this was 33 ° C (Table 2). In a similar work with *Fusarium equiseti*, Hosamani et al (2011) incubated the microorganism at various temperatures in specific experimental conditions and the results indicated that 45 ° C was the optimum temperature for the production of L-asparaginase (6.85 U/mL).

Incubation temperature, 48h culture (°C)	27°C	30°C	33°C	37°C	40°C
Enzyme activity L-asparaginase (U/mL)	10.4	15.1	17.8	15.5	2.0

Table 2. Effect of incubation temperature in the enzyme production

It appears that any temperature beyond the optimum range has an adverse effect on metabolic activities of microorganisms and it is reported that the metabolic activities become more slowly at lower temperatures (CARRIZALES and JAFFE, 1986). As this fungal isolate exhibited production L-asparaginase activity, further experimentation is needed on nutritional and cultural amendments in order to confirm its potential for enzyme. From the observations, clearly, was indicated that *P. variotii* has high ability to produce significant amount of L-asparaginase at specific temperature and pH and that the process of solid state fermentation is efficient and possibly viable for the production of this enzyme in scale industrial. However, further experiments are needed to assess whether the use of L-asparaginase produced by *P. variotii* will have fewer adverse in leukemic patients.

REFERENCES

CARRIZALES, V.; JAFFE, W. **Solid state fermentation an appropriate biotechnology for developing countries**. Interscience, 11, 9-15, 1986.

SARQUIS, M. I. M. et al. **Production of L-asparaginase by filamentous fungi**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.

GULATI, R. et al. **A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms**. Letters in applied microbiology, v. 24, n. 1, p. 23–26, 1997.

GRAHAM, M. L. **Pegaspargase: A review of clinical studies** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, pp. 1293-1302, 2003.

HOSAMANI, R. et al. **Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti***. Inter. J. Microbiol. Res., v. 3, p. 108–119, 2011.

IMADA, A. et al. Asparaginase and glutaminase Activities of Micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85–99, 1973.

SOUZA, M. G. S. Prospecting of microbial enzymes: obtaining peroxidase of biotechnological interest from filamentous fungi isolated from seeds of *Carapa guianensis* Aublet. Master's Dissertation in Biotechnology. Federal University of Pará, 2013.

VERMA, N. et al. L-Asparaginase: **A Promising Chemotherapeutic Agent**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

EVALUATION OF METHYLOCYSTIS HIRSUTA GROWTH ON SUPPLEMENTED MINERAL MEDIA USING METHANE AS CARBON SOURCE

Rodrigo Pimentel Fernandes

Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – Rio de Janeiro

Ana Cristina Pantoja Simões

Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – Rio de Janeiro

Manuela Temtemples de Carvalho

Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – Rio de Janeiro

Camila Ruiz Lopes

Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – Rio de Janeiro

Nei Pereira Jr

Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – Rio de Janeiro

RESUMO: A crescente demanda por alimentos incentiva a procura por novas fontes proteicas, nos levando a buscar por diferentes alternativas. Microrganismos que utilizam metano como fonte de carbono, além de serem utilizados com este propósito, possuem a vantagem de utilizar um gás do efeito estufa como substrato, mitigando os efeitos deste poluente na atmosfera. Este trabalho visou obter um meio de cultivo adequado

para o crescimento de *Methylocystis hirsuta* utilizando frascos agitados e um biorreator agitado mecanicamente. Foram utilizados suplementos para o meio mineral, de forma a aumentar a disponibilidade de nutrientes para a célula, e o seu uso mostrou-se eficiente, com aumentos de até 88% na concentração final de células. Os valores máximos de densidade celular obtidos foram de 0.75 g/L para os frascos agitados e 2.6 g/L para biorreator.

PALAVRAS-CHAVE: Metanotróficas, Proteína de Unicelular, *Methylocystis hirsuta*, metano

ABSTRACT: The growing demand for food promotes the search for new protein sources, leading us to look for different alternatives. Microorganisms that use methane as substrate, in spite of being used for feeding purpose, have the advantage of using a greenhouse gas as carbon source, mitigating the effects of this pollutant on the atmosphere. This work aimed to obtain a culture medium suitable for the growth of *Methylocystis hirsuta* using shake flasks and a stirred tank bioreactor (STR). Supplements were used for the mineral medium in order to increase the availability of nutrients, and their use proved to be efficient, with increases up to 88% in final cell concentration. Maximum values of cell density obtained were 0.75 g/L for the shake flasks and 2.6 g/L for the stirred tank.

KEYWORDS: Methanotrophs, Single Cell

1 | INTRODUCTION

Methanotrophic bacteria are microorganisms capable of using methane as carbon source. The interest in their use can be justified by the consumption of this greenhouse gas, reducing its concentration in the atmosphere, and the low cost of this raw material, being able to generate products with high added value (Shindell *et al.*, 2012) and low cost. These bacteria have potential to be applied in bioremediation (Wilson & Wilson, 1985), PHB production (Wendlandt *et al.*, 2001), nitrogen fixation (Auman *et al.*, 2001) and, above all, single cell proteins (SCP) (Pereira Jr., 2012), due to its importance in the world scenario of population growth and crescent demand for food.

Compared with most common sources of proteins, SCP is characterized by a number of advantages, such as: higher protein synthesis rate in prokaryotes, high protein content and independence in seasonal factors (Adebayo *et al.*, 2011; Nasser *et al.*, 2011). The objective of this work is to evaluate culture media composition for growth of methanotrophic bacteria *Methylocystis hirsuta*, in shake flasks and a stirred tank bioreactor (STR), aiming to achieve high cell concentrations.

2 | MATERIALS AND METHODS

The culture medium used to grow *Methylocystis hirsuta* was the *American Type Culture Collection* (ATCC) NMS 1306, removing the iron chelate solution and with addition of a 1.4 mg/L CuSO_4 solution. Cell growth was carried out in previously sterilized penicillin flasks with controlled atmosphere, suitable for small-scale culture of methanotrophic bacteria. Since culture media is composed of a one-carbon source (methane) and a basic mineral medium, bacterial growth may require supplementation to reach high cell densities. Hence, yeast extract (YE), peptone (P) and casamino acids (CAS) were added and had their influence investigated. Assays were performed in a rotary shaker at 200 rpm and temperature of 30°C, with a 24-hour interval between feedings.

First, in order to enhance availability of vitamins, cofactors and nitrogen sources for *M. hirsuta*, yeast extract, peptone and casamino acids were individually added to culture media, each of them at 0.5 g/L, 1.0 g/L and 2.0 g/L, and respective cell concentrations were evaluated. Furthermore, mixtures composed of yeast extract/peptone (YE + P) and yeast extract/casamino acids (YE + CAS), at 0.25 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L and 2.0 g/L, of each component, were added and had its effects analyzed. Gas feeding composition was 30% methane and 70% air.

After supplementation assays, a STR was used to enhance the mass transfer of gases into the liquid phase. The bioreactor was operated with a volume of 1 L of

modified NMS 1306 supplemented with yeast extract and casamino acids at 2 g/L each and pH, temperature and dissolved oxygen controlled. Medium feedings were done with the purpose of maintaining the total volume, as well as the concentrations of supplements, at suitable levels for the microorganism growth.

3 | RESULTS AND DISCUSSIONS

Modified NMS1306 supplemented with yeast extract, peptone and casamino acids led to higher growth rates and final cell concentrations when compared to control, as shown in Table 1.

Supplements	Concentration of supplements (g/L)			
	0.25	0.5	1.0	2.0
	Cell Concentration (g/L)			
YE	-	0.37	0.40	0.47
P	-	0.31	0.36	0.38
CAS	-	0.38	0.41	0.43
YE + P	0.37	0.36	0.42	0.44
YE + CAS*	0.52	0.54	0.54	0.75
Control	0.29			

Table 1. Cell concentration of *M. hirsuta* for different concentrations of yeast extract (YE), peptone (P) and casamino acids (CAS) in modified NMS 1306 (T= 30°C and pH 7.0).

*Control used for this condition had a final concentration of 0.40 g/L of cells.

For all supplements added, increases in initial loadings promoted higher cell growth. The use of yeast extract increased bacterial growth from 0.29 to 0.47 g/L, a result 62 % superior in comparison to the control flask without any supplements. On the other hand, peptone and casamino acids promoted increases equivalent to 31 % and 48 %, respectively. Addition of the mixture “YE + P”, each of them at 2 g/L, led to a 52 % improvement in cell concentration, while for the mixture “YE + CAS” results were 88 % superior, indicating this one as the most promising mixture for future assays. The use of both sources, even elevating costs associated to the process, is responsible for providing a wider variety of biomolecules to the mineral medium, which is interesting when working with more dense cultures of cells, such as those in bioreactors, where depletion of components is more likely to occur.

Results obtained for the STR experiment were better than the ones shown in shake flasks, with cell density reaching 2.6 g/L in 54 hours. It was needed to make medium replenishment to maintain cell growth after inactivity at 30 and 48 hours. This higher result reinforces the relevance of maintaining optimal process conditions, such as temperature and pH, and constant aeration and feeding (air and methane). Another aspect of utmost importance regards the enhanced mass transfer promoted by this system, which could increase the availability of methane (substrate) and air in the liquid phase.

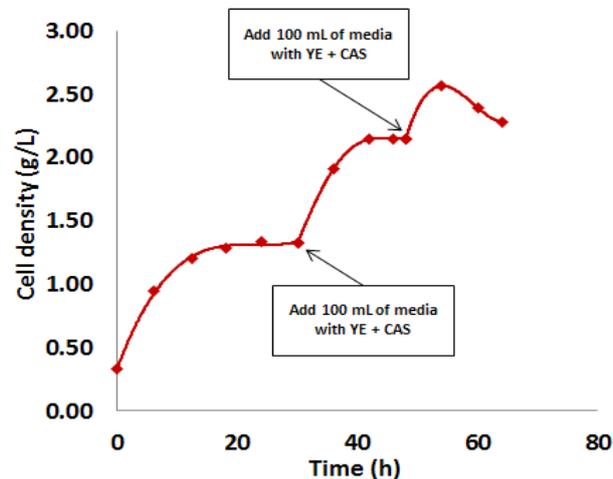


Figure 1. Growth kinetics of *M. hirsuta* in STR with modified NMS 1306 supplemented with 2 g/L of yeast extract and casamino acids (T= 30°C and pH 7.0).

4 | CONCLUSIONS

Addition of supplements made it possible to reach higher cell concentrations than on the control, indicating essentialness of media supplementation. For assays carried out in bioreactor, further studies are required, aiming at improving cell concentrations and optimizing methanotrophs culture, using previously optimized supplemented medium and other process conditions, such as new bioreactors configurations. Combination of other supplements and substances that may improve gas transfer to the liquid phase ought to be investigated to more conclusions about their effect and importance.

REFERENCES

- Adedayo, M.R., Ajiboye, E.A., Akintunde, J.K., Odaibo, A., 2011. **Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer**. *Advances in Applied Science Research* 2, 5, 396-409.
- Auman, A.J., Speake, C.C., Lidstrom, M.E., 2001. **nifH Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs**. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5, 4009-4016.
- Nasseri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2011. **Single Cell Protein: Production and Process**. *American Journal of Food Technology*, 6, 2, 103-116.
- Pereira Jr., N., 2012. **Relatório Técnico: Produção de Proteínas para Alimentação Animal a partir de Gás Natural**. Rio de Janeiro, 70 p.
- Shindell, D., Kuypenstierna, J.C., Vignati, E., Van Dingenen, R., Amann, M., Klimont, Z., Anenberg, S.C., Muller, N., Janssens-Maenhout, G., Raes, F., et al., 2012. **Simultaneously Mitigating Near-Term Climate Change and Improving Human Health and Food Security**. *Science* 335, 183-189.
- Wendlandt, K.D., Jechorek, M., Helm, J., Stottmeister, U., 2001. **Producing Poly-3-Hydroxybutyrate with a High Molecular Mass from Methane**. *Journal of Biotechnology* 86, 127-133.
- Wilson, J.T., Wilson, B.H., 1985. **Biotransformation of trichloroethylene in soil**. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 242-243.

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMATIC EXTRACT WITH CELULOLYTICAL ACTIVITY FROM AGROINDUSTRY RESIDUES

Ivanilton Almeida Nery

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis
Nilópolis, Rio de Janeiro

Karine Belo Rocha de Lima

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis
Nilópolis, Rio de Janeiro

Marlon Castro da Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis
Nilópolis, Rio de Janeiro

Edmir Fernandes Ferreira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis
Nilópolis, Rio de Janeiro

ABSTRACT: Beer consumption in Brazil has generated a great environmental problem due to the final destination of the malt bagasse. To minimize generation of this residue implies in the use of this bagasse in biotechnological researches of industrial interest, as production of enzymes, whose characteristics are their high specificity in catalytic action, high efficiency in moderate temperature, pressure and pH conditions and minimization of toxicological and environmental problems. This work aims to comparatively evaluate the production of exoglucanase among the filamentous fungi

Aspergillus niger and *Penicillium glabrus* from the malt bagasse moistened in semi-solid fermentation medium and water used to wash malt bagasse as substrate of submerged fermentation. In order to evaluate the production of exoglucanases, was produced a fermentation system of malt bagasse washed and moistened with water, a spore suspension with 7 days growth and spore numbers equal to 5×10^7 spores / mL. Also, water used to wash crude malt bagasse was used as substrate to submerged fermentation of extracts with cellulolytical activity, using same filamentous fungi. It is observed an interesting behavior of *P. glabrus* in the washing water ($0,32 \mu\text{mol}/\text{min}$), obtaining the best production of cellulolytical activity in relation to the other conditions of fermentation.

KEYWORDS: Filamentous Fungi, Fermentation, Cellulolytical Activity

1 | INTRODUCTION

Lignocellulosic materials from Brazilian agroindustry waste can be an interesting input to obtain products obtained by different routes that take advantage of their chemical or biotechnological energy (BON, 1993).

Enzymes are biomolecules (largely protein) specialized in the catalysis of biological reactions. They are among the most notable

biomolecules because of their extraordinary specificity and catalytic power, with efficiency comparable to synthetic catalysts, since virtually all reactions that characterize cellular metabolism are catalyzed by enzymes.

Cellulose, among polymer biomolecules, is one of the most abundant biopolymers in the world and can be hydrolyzed with acids to form glucose. The microbial degradation of cellulose is total and specific and has stimulated the use of cellulolytic fermentation processes by man. In nature, these processes represent the largest source of carbon to the soil. The hydrolysis of cellulose by cellulases results in the final production of glucose. Some alternatives for the production of cellulases are through Submerged Fermentation (SF), which consists of the fermentation in aqueous medium, and Solid Substrate Fermentation (SSF), which can be defined as a process in which a porous solid matrix (substrate) is put in contact with a culture of microorganisms, containing sufficient amount of water that guarantees the growth and the metabolic activities of the cells, without the capacity of water retention by the porous matrix being exceeded. This technique has several advantages, such as ease of handling, low operating costs and the obtaining of enzymes from the reuse of various types of agro-industrial lignocellulosic residues, which present low acquisition costs and in many cases are considered environmental problems. In this way, Fermentation in solid medium contributes to the reduction of solid pollutants, transforming them into products of high added value, such as: enzymes, polysaccharides, antibiotics, among others. In solid-medium fermentation, the enzyme complex is produced in a more concentrated form and the cellulose present in the malt bag induces the improvement of the enzymatic production.

In this context, this work seeks to obtain enzymatic extracts with cellulolytic activity, from solid substrate fermentation (using brewing malt bagasse as substrate) submerged fermentation (using as substrate residual malt bagasse washing water), without complements or previous treatment, using, as fermentation agent, strains of *Aspergillus niger* and *Penicillium glabrum*.

2 | MATERIAL AND METHODS

Microorganism (*Penicillium glabrum* and *Aspergillus niger*) - From test tubes containing the microorganisms, in the Laboratory of Microbiology. Filamentous fungi are part of the Microbiology Laboratory of the IFRJ Campus Nilópolis.

Substrates

Liquid Substrate: Liquid substrate to Submerged Fermentation were collected from washing of brewing malt bagasse with water until absence of reducing sugars on last washing (DNS qualitative test).

Solid Substrate: washed and dry malt bagasse were used as substrate in proportion of 1:1 with water, as described below.

Fermentation Solid Substrate Fermentation - Tubes with filamentous fungi will be used to obtain spore suspension, counting by means of microscopy in a Neubauer chamber. 125 ml vials containing 10g of substrate (5g of humid malt bagasse with 5ml of water) and 5×10^7 cells / ml of the microorganisms will be prepared. After sterilization, the vials was inoculated with a suspension of 10^7 spores of microorganisms and incubated for 7 days at 25 ° C.

Submerged Fermentation-Washing water from malt bagasse (without complement) was autoclaved in conic flasks of 125 mL, inoculated with a suspension of 10^7 spores of microorganisms and incubated for 7 days at 25 ° C.

Enzyme extract and Celulolytical activity - After the extraction period, after fermentation, 50 ml of distilled water will be added to the fermenter, which was homogenized on a shaker table with a rotation of 80rpm in a period of one hour. Vacuum filtration was done using Millipore 0.2 μ m Φ 47 \pm 0.5mm membrane, thus obtaining the enzymatic extract. Carboxy methyl cellulose (CMC) solution diluted in 0.01 mol / L acetate buffer under pH 5.0 was used to verify cellulolytic activity, using the DNS (3,5-Dinitrosalicylate) technique for the determination of sugars Reducers. Absorbance was read in a spectrophotometer at 570nm.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows results of cellulolytic activity of the enzymatic extracts from the submerged and solid fermentations of the filamentous fungi *A. niger* and *P. glabrus*. It is observed an interesting behavior of *P. glabrus* in the washing water, obtaining the best production of cellulolytic activity (0,32 μ mol/min) in relation to the other conditions of fermentation. The reducing sugars of the washing water were quantified, obtaining 0.12% of residual sugars. These residual sugars from the washing water, as well as the presence of residual material from the bagasse itself, such as colloids and residual lignocellulosic material, may have stimulated the higher production of cellulolytic activity in relation to the others. The best performance of *Aspergillus niger* was also observed against growth conditions in malt bagasse (0,25 μ mol/min).

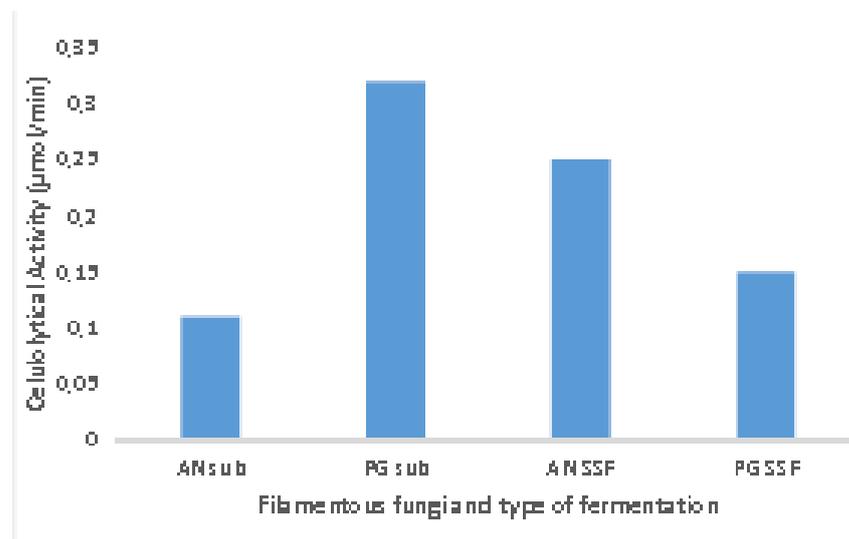


Figure 1 – Celulolytical activity of enzymatic extracts from different substrates and different filamentous fungi (AN sub -*Aspergillus niger* in submerged fermentation; PG sub – *Penicillium glabus* in submerged fermentation; AN SSF – *Aspergillus niger* in Solid Substrate Fermentation, PG SSF – *Penicillium glabus* in Solid Substrate Fermentation)

REFERENCES

BON, E.P. **A importância do desenvolvimento da tecnologia enzimática no Brasil**. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 1993, Rio de Janeiro. Resumo Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.5-7.

BORRIS, R. **Biology of enzymes**. In: REHM, H.J.; REED, O.G. (Ed.) *Biotechnology*. Weinheim: VCH, 1987. v.7a., Cap. 2.

DZIEZAK, J.D. **Enzymes: catalysts for food**. *Processes Food Technology*, p.78-85, Jan.1991.

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA PALMA DE ÓLEO (*ELAEIS SP*) PARA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *PLEUROTUS OSTREATUS*

Jhonatas Rodrigues Barbosa

Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Belém-Pará.

Maurício Madson dos Santos Freitas

Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Belém-Pará.

Marcos Enê Chaves Oliveira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Departamento de Agroindústria, Belém-Pará.

RESUMO: O óleo de palma é o principal óleo da matriz mundial de óleos vegetais e sua produção gera uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos e efluente líquido com potencial de aplicação biotecnológica. Dentro deste contexto, a produção de biomassa fúngica e exopolissacarídeos pode ser uma alternativa para reaproveitamento destes resíduos, assim como já vem sendo feito com resíduos de outros produtos agroindustriais como a cana-de-açúcar e milho. Com o objetivo de avaliar a produção de biomassa e exopolissacarídeos em cultivo submerso com o cogumelo *Pleurotus ostreatus* foram realizados ensaios fermentativos com diversas formulações contendo os resíduos da agroindústria da palma de óleo, POME (Palm oil mill effluent) e borra sólida do tridecanter. Os

ensaios foram conduzidos em frascos agitados e avaliados quanto a produção de biomassa e exopolissacarídeos. Os resultados de biomassa e exopolissacarídeos indicam que os tratamentos com maior quantidade de substrato (resíduos), foram os que melhor produziram biomassa e exopolissacarídeos em 10 dias de cultivo. Assim, os tratamentos T4 e T5 foram os que apresentaram melhores resultados na produção destes parâmetros, além da produção de biofilmes. O tratamento T5 apresentou a maior produção de biomassa e exopolissacarídeos, durante o processo fermentativo. Os resultados reforçam a importância do aproveitamento integral dos resíduos agroindústrias, dentro de uma perspectiva de inovação tecnológica em bioprocessos.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos de Palma de óleo; *Pleurotus ostreatus*; Exopolissacarídeos.

ABSTRACT: Palm oil is the main oil in the world vegetable oil matrix and its production generates a large amount of lignocellulosic waste and liquid effluent with potential for biotechnological application. Within this context, the production of fungal biomass and exopolysaccharides can be an alternative to reuse these waste, as it has been done with waste from other agroindustrial products such as sugar cane and corn. In order to evaluate the production of biomass and exopolysaccharides in culture submerged with

the *Pleurotus ostreatus* mushroom, fermentation tests were carried out with several formulations containing the oil palm agroindustry waste, POME (Palm oil mill effluent) and solid tridecanter sludge. The tests were conducted in shaken flasks and evaluated for the production of biomass and exopolysaccharides. The results of biomass and exopolysaccharides indicated that the treatments with the highest amount of substrate (waste) were the ones that produced the best biomass and exopolysaccharides in 10 days of cultivation. Thus, T4 and T5 treatments presented the best results in the production of these parameters, in addition to the production of biofilms. The T5 treatment showed the highest biomass and exopolysaccharides production during the fermentation process. The results reinforce the importance of the integral use of the agroindustry waste, within a perspective of technological innovation in bioprocesses.

KEYWORDS: Oil Palm Waste; *Pleurotus ostreatus*; Exopolysaccharides.

1 | INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos de fungos formadores de cogumelos, principalmente os comestíveis como os do gênero *Pleurotus* vem sendo amplamente estudados devido as suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade e potenciais atividades biológicas como anti-inflamatórias, antitumorais e antidiabéticas (PAPASPYRIDIS et al., 2012; HELENO et al., 2015; RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015).

Os exopolissacarídeos são macromoléculas de alto peso molecular excretadas pelas células para o meio externo como resposta às condições de cultivo e principalmente influenciada pela composição de carbono, nitrogênio e pH do meio de cultivo (RUTHES, SMIDERLE; IACOMINI, 2015). Um dos exemplos mais clássicos é a produção de pululana com o fungo *Aureobasidium pullulans* utilizando o meio de cultivo POL. Este exopolissacarídeos tem amplas aplicações industriais e farmacêuticas (GIBBS; SERVIOUR, 1998; HELENO et al., 2015).

O gênero *Pleurotus*, por outro lado, é responsável pela produção de glucanas extracelulares que são utilizadas em fármacos e alimentos (HELENO et al., 2015).

Na produção industrial o custo do meio de cultivo é um importante fator para a viabilidade econômica da produção de exopolissacarídeos, sendo que meios complexos como o POL são onerosos por apresentarem constituintes caros como peptonas e extrato de levedura, além de glicose e outros sais (DICHINSON, 2015). Em vista disto, fontes alternativas de carbono, nitrogênio e micronutrientes de baixo custo e com potencial para uso em cultivo submerso de fungos voltados para a produção de exopolissacarídeos são uma forma de diminuição do custo de produção destes compostos. Em vista disto, meios alternativos baseados em resíduos agroindustriais vêm sendo testados como, por exemplo, resíduos agroindustriais da cana de açúcar, de trigo e de milho (BONATTI, KARNOPP, SOARES; FURLAN, 2004).

Atualmente o Brasil vem se destacando no cenário internacional de produção de óleo de palma, sendo que o estado do Pará é responsável por mais de 90% da

produção brasileira de óleo de palma (*Elaeis guineenses*) e a agroindústria de extração deste óleo gera da ordem de duas toneladas de efluente para cada tonelada de óleo produzida, sendo que só em 2018 são estimadas a produção de mais de 1,2 milhão de toneladas de POME – Palm Oil Mill Effluent, juntamente com o POME é gerada ainda a borra do tridecanter. Estes resíduos da agroindústria da palma de óleo podem ser uma alternativa viável para produção de biomassa fúngica e exopolissacarídeos em cultivo submerso.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biomassa fungica e exopolissacarídeos em cultivo submerso do fungo *Pleurotus Ostreatus* em resíduos da palma de óleo.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e manutenção

Para este estudo foi utilizada uma cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* adquirida da Brasmicel. A manutenção da cepa foi feita a cada três meses em BDA (Batata Dextrose Ágar). As placas colonizadas com o micélio fúngico foram utilizadas como inóculo para os ensaios em frascos agitados.

2.2 Substratos

Para a avaliação de produção de polissacarídeos extracelular do fungo foram utilizados substratos compostos de resíduos da agroindústria da palma de óleo. Os resíduos utilizados foram o efluente líquido (POME), e a borra sólida de tridecanter, ambos foram adquiridos entre os dias 12 e 16 de março de 2017 no polo de produção de óleo de palma da DENPASA, localizada no km 12 da PA 240, município do Tauá, Pará, Brasil

2.3 Produção de Exopolissacarídeos (EPS) em Frascos Agitados

A produção biotecnológica de exopolissacarídeos foi feita em cultivo submerso contendo diferentes formulações de POME (Palm Oil Mill Effluent) e borra sólida. Foram realizados 5 tratamentos cujas formulações são descritas na tabela. 1, a seguir.

Tratamentos	Concentração de borra sólida (g)	Concentração de POME (mL)
T1	1,0	10,0
T2	3,3	27,5
T3	5,5	45,0
T4	7,8	67,5
T5	10,0	90,0

Tabela 1. Planejamento experimental dos ensaios para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e exopolissacarídeos.

Cada tratamento foi completado o volume para 100 mL com água deionizada e o cultivo foi realizado em frasco de erlenmeyer de 250 mL contendo cada meio específico, conforme a formulação descrita anteriormente em triplicata. Os meios foram esterilizados a 121°C e inoculados com a biomassa total de duas placas de BDA de 52,15 mm de diâmetro colonizadas com o micélio fúngico. Os fracos foram incubados em câmara de incubação do tipo SHAKER- MA-420 (MARCONI), velocidade de agitação de 150 rpm e 30 °C por 10 dias. A cada 48 horas uma amostra de 2 mL foi retirada para quantificação de exopolissacarídeos pelo método fenol-sulfúrico (ROSADO et al., 2002).

2.4 Quantificação da Biomassa Fúngica

Após o termino do processo fermentativo a biomassa micéial total de cada tratamento foi separada do sobrenadante por centrifugação (5000 rpm por 10 minutos). Esta biomassa separada foi pesada e em seguida colocada para secar em estufa a 75°C por 48 horas (DUBOIS, GILLES, HAMILTON, REBERS; SMITH, 1956).

2.5 Extração e Quantificação de Exopolissacarídeos (EPS)

Para a extração de EPS, as amostras de 2 mL coletadas a cada 48 horas de cultivo de todos os tratamentos em triplicata foram centrifugadas (14000 rpm por 10 minutos), para separar a biomassa do sobrenadante. 0,2 mL do sobrenadante de cada amostra centrifugada foi retirada e adicionou-se etanol 96% frio (4°C) a uma proporção de etanol: sobrenadante de 1:4 (v / v) para precipitar os EPS (LEE et al., 2003).

O total de EPS precipitado foi suspenso em água deionizada para completar 1 mL, em seguida foi retirada 0,1 mL da amostra suspensa de EPS em água e foram feitas diluições dessa para 2 mL. Desta amostra diluída 200 vezes foi retirada uma subamostra de 0,5 mL para determinação da concentração total de açúcares pelo método colorimétrico Fenol Sulfúrico (DUBOIS, GILLES, HAMILTON, REBERS; SMITH, 1956), o qual foi subsequentemente analisado em espectrofotômetro UV-Vis (Agilent Technologies) a 490 nm. A construção da curva padrão foi feita com glicose PA com concentração entre 0,1 a 0,01 g.L⁻¹. A purificação parcial do polímero foi feita com lavagens com etanol para eliminar componentes solúveis dos meios de cultura.

2.6 Análises Estatísticas

A análise estatística foi feita em *software* em linguagem R com análise de variância mista de dois fatores e medidas repetidas, sendo o tempo o fator intraindivíduo e o grupo de tratamentos os fatores entre indivíduos. Na existência de interação entre os fatores, procedeu-se à avaliação da interação por meio do método de Tukey ao nível de confiança de 95%.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Definição da melhor composição do meio de cultivo para produção de biomassa e exopolissacarídeos

Os perfis de açúcares totais solúveis durante o período fermentativo para cada um dos cinco tratamentos são apresentados na (fig. 2). A análise estatística dos dados apresentados nesta figura revelou que houve presença de interação entre tratamentos e tempo.

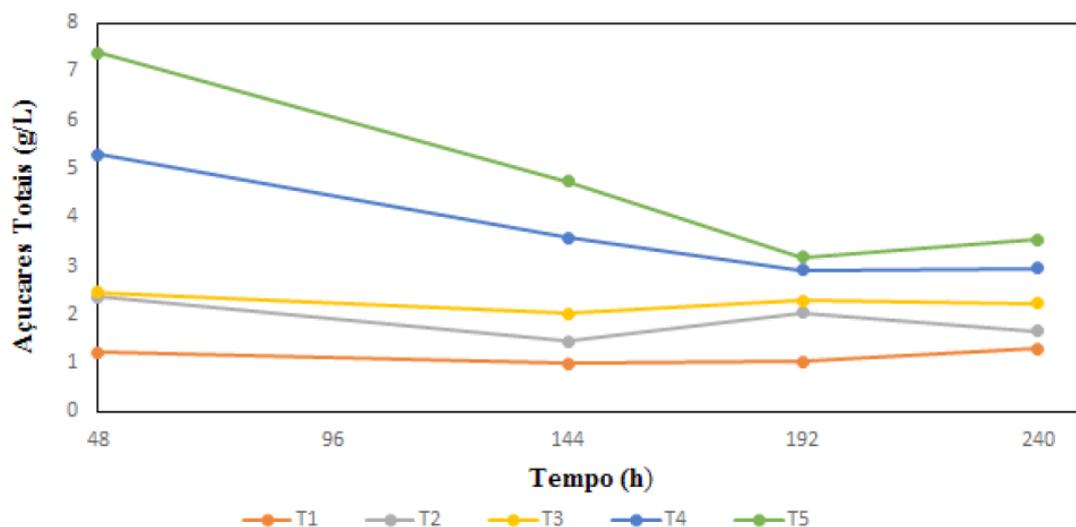


Figura 2. Perfil dos açúcares solúveis totais de cada tratamento ao decorrer do tempo de fermentação.

Observa-se na (fig. 2) que, de forma geral, há inicialmente uma diminuição acentuada dos açúcares totais e que ao passar do tempo há uma tendência de estabilização ou uma ligeira elevação do teor total de açúcares. Considerando os tratamentos T2 e T3, o consumo de substrato é acentuado até 144 horas, em seguida observam-se indícios de crescimento na produção de açúcares totais que pode ser interpretado como produção de exopolissacarídeos. Entretanto, considerando-se a análise estatística, resumida na tabela. 2, verifica-se que não houve diferença estatística ao nível de significância α 0,05 entre os diferentes intervalos de tempo.

Tratamentos	Tempo	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança (95%)
T1	48 h	3	0,9736	1,6055	1,2252	0,1934	0,3350	(0,3930; 2,0575)
	144 h	3	0,9205	1,0895	0,9993	0,0491	0,0851	(0,7879; 1,2106)
	192 h	3	0,9355	1,1232	1,0367	0,0547	0,0947	(0,8014; 1,2720)
	240 h	3	0,8700	1,5365	1,3055	0,2179	0,3774	(0,3681; 2,2429)
T2	48 h	3	1,7276	3,4976	2,3639	0,5683	0,9842	(-0,0811; 4,8089)
	144 h	3	1,2621	1,6480	1,4500	0,1115	0,1931	(0,9702; 1,9298)
	192 h	3	1,7745	2,4799	2,0412	0,2210	0,3829	(1,0901; 2,9923)
	240 h	3	1,3833	2,1126	1,6686	0,2250	0,3897	(0,7006; 2,6366)
T3	48 h	3	2,0790	2,8710	2,4560	0,2294	0,3974	(1,4688; 3,4431)
	144 h	3	1,7701	2,4206	2,0297	0,1989	0,3446	(1,1738; 2,8856)
	192 h	3	1,9692	2,4799	2,2925	0,1623	0,2812	(1,5940; 2,9911)
	240 h	3	2,1020	2,3091	2,2250	0,0629	0,1089	(1,9545; 2,4955)
T4	48 h	3	4,4578	5,7048	5,2865	0,4143	0,7177	(3,5037; 7,0692)
	144 h	3	3,3941	3,9083	3,5853	0,1624	0,2813	(2,8864; 4,2841)
	192 h	3	2,3507	3,2312	2,9171	0,2837	0,4915	(1,6962; 4,1379)
	240 h	3	2,7763	3,1268	2,9589	0,1015	0,1757	(2,5224; 3,3954)
T5	48 h	3	6,7509	8,0899	7,3781	0,3888	0,6735	(5,7050; 9,0511)
	144 h	3	4,6517	4,8561	4,7346	0,0621	0,1075	(4,4674; 5,0017)
	192 h	3	2,5923	3,5640	3,1897	0,3019	0,5228	(1,8909; 4,4885)
	240 h	3	3,4755	3,6029	3,5410	0,0368	0,0638	(3,3825; 3,6994)

Tabela 2. Análise estatística descritiva dos tratamentos em função do tempo de cultivo, ao nível de significância de α 0,05.

Analisando-se os tratamentos T4 e T5, nota-se que as taxas de consumo de açúcares totais são acentuadas até 192 horas, quando se observam indícios de crescimento na produção de exopolissacarídeos até 240 horas. Estatisticamente, entretanto, foi observado que não há diferenças entre os resultados a partir do tempo de 144h. A produção de exopolissacarídeos para o tratamento T5 é consideravelmente alta ($3,60 \text{ g.L}^{-1}$) em 10 dias de cultivo, quando comparada a valores encontrados por outros autores como $3,15 \text{ g.L}^{-1}$ encontrado por Vamanu (2012), em meio composto por extrato de milho seco e suplementado com sais de sódio, magnésio, cálcio e amido de milho, cultivado em um biorreator de 4 litros, nas condições de 25°C , velocidade de agitação de 150 rpm, pH 5,5 e cultivado por 10 dias. Rosado et al., (2002), avaliaram a produção de exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* variando a concentração de sulfato de amônio em meio tradicional (POL), os melhores resultados foram $1,4 \text{ g.L}^{-1}$ em 12 dias de cultivo. Este resultado indica que esta é uma boa formulação do ponto de vista de volume de exopolissacarídeo produzido, restando avaliar o tipo de composto obtido nestas condições.

Quanto ao tratamento T1, observa-se que a produção de açúcares totais praticamente não mudou durante o processo fermentativo e a produção de exopolissacarídeos não pode ser observada. Estatisticamente, conforme apresentado na tabela 2, não houve diferença entre os diferentes intervalos de tempo, comprovando a constância dos açúcares totais observada no gráfico.

Todos os tratamentos apresentaram crescimento micélio sem a presença de contaminação. Observou-se também que as hifas formadas apresentavam distribuição pelo substrato, colonizando completamente o mesmo. Somente os tratamentos T4 e T5 apresentaram alta viscosidade e formação de biofilme no substrato. Os tratamentos com produção de biofilmes e limos fora da parede celular apresentam maior potencial para comercialização, pois a recuperação dos exopolissacarídeos do meio fermentativo é mais simples (RUTHES, SMIDERLE; IACOMINI, 2015).

Na figura 3 apresenta-se a relação entre a biomassa final seca, correspondente à massa micélio nos meios de cultivo, e a biomassa seca dos substratos (resíduos).

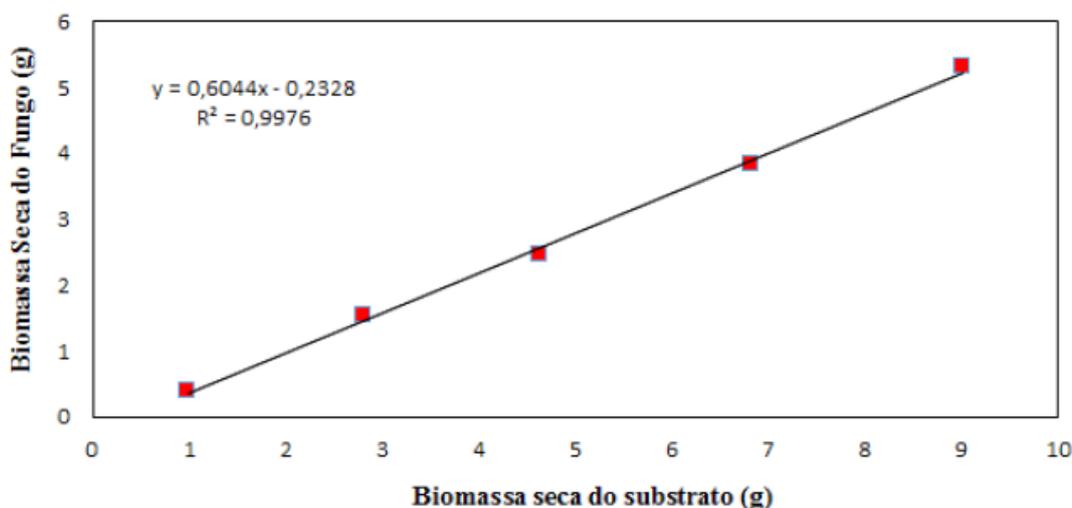


Figura 3. Correlação entre a biomassa seca do fungo *Pleurotus ostreatus* e a biomassa seca dos substratos.

Verifica-se na (fig. 3) que há uma correlação linear entre as mesmas, ou seja, um aumento na biomassa dos substratos (resíduos) implica em um aumento na biomassa micélio final com fungo. Isto implica que a produção de exopolissacarídeos de cada tratamento é diretamente proporcional à biomassa de substrato, ou seja, os tratamentos com a maior produção de biomassa fúngica foram os que apresentaram maior produção de exopolissacarídeos. Este resultado corrobora com o observado na (Fig. 2), onde se verifica que a concentração final de polissacarídeo cresce com o aumento da biomassa de substrato nos tratamentos.

Conforme observado nos resultados em cada tratamento, as formulações contendo POME e borra sólida proporcionaram um meio complexo de carboidratos e nitrogênio adequado para o crescimento do fungo, o que foi demonstrado com os resultados de biomassa e de exopolissacarídeos.

4 | CONCLUSÕES

A utilização de resíduos da palma de óleo como elementos de formulação de substrato para o cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* mostrou-se viável, tanto para a produção de biomassa quanto para a síntese de exopolissacarídeos, sem a necessidade de acréscimo de qualquer outra suplementação ao meio. Observou-se que a produção de biomassa total de micélio fúngico em cada tratamento foi proporcional à biomassa de resíduos no substrato. Em vista disto, o tratamento T5, com maior concentração de biomassa residual de palma, levou à maior produção de biomassa fúngica, bem como à maior produção de exopolissacarídeos em cerca de 240 horas de avaliação. Os resultados demonstram a importância da aplicação dos resíduos agroindustriais em uma nova cadeia biotecnológica, com geração de resíduos mínimos, sendo uma tecnologia inovadora em bioprocessos.

REFERÊNCIAS

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, p. 425-428, 2004.

DICHINSON, E. Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein stabilized oil droplets. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 224-241, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

GIBBS, P. A.; SERVIOUR, R. J. The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 168-174, 1998.

HELENO, S. A.; FERREIRA, R. C.; ANTONIO, A. L.; QUEIROZ, M. J. R. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. R. F. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. **Food Bioscience**, v. 2, p. 48-55, 2015.

LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 574-581, 2003.

PAPASPYRIDIS, L. M.; ALIGIANNIS, N.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; FOKIALAKIS, N. Submerged fermentation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor as a promising alternative for the effective production of bioactive metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 2714-2724, 2012.

ROSADO, F. R.; CARBONERO, E. R.; KEMMELMEIER, C.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. I.; IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1→4)-linked β -D-galactan and β -D-mannan from *Pleurotus ostreatus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 261-265, 2002.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 753-761, 2015.

VAMANU, E. Biological Activities of the Polysaccharides Produced in Submerged Culture of two Edible *Pleurotus ostreatus* Mushrooms. **Journal of Biomedicine and Biotchnology**, v. 1, p. 8. 2012. Acesso em: 17 de maio de 2018. Disponível em:< <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/565974/>>.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 E DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS DE FRUTAS COMO SUBSTRATOS

Camylla Carneiro Soares

Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química
Salvador – Bahia

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade

Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
João Pessoa – Paraíba

Fábio Cirqueira da Silva

Universidade Salvador, Escola de Arquitetura, Engenharia e TI
Salvador - Bahia

Andréa Farias de Almeida

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia
João Pessoa – Paraíba

Janice Izabel Druzian

Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química
Salvador – Bahia

Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato

Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química
Universidade Salvador, Escola de Arquitetura, Engenharia e TI
Salvador – Bahia

RESUMO: Os biossurfactantes são compostos de atividade superficial derivados de microrganismos e que oferecem diversas

vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade e possibilidade de serem produzidos a partir de recursos renováveis. Entretanto, apesar dessas vantagens, o custo do processo de produção de biossurfactantes é elevado. Uma alternativa para isto é utilizar substratos com baixo valor agregado, como os resíduos agroindustriais, uma vez que os custos com substrato podem chegar a até 30% das despesas do processo. Neste estudo, resíduos de mamão e maracujá foram utilizados como substratos para a produção de biossurfactante por uma linhagem de *Bacillus subtilis*. A fermentação submersa foi realizada em agitador orbital a 37 °C e 200 rpm durante 96 h. A cepa se adaptou bem ao substrato utilizando resíduos de mamão com concentração máxima de 1,0660 g.L⁻¹, redução da tensão superficial de 25,5% e índice de emulsificação de 61,54%. Estes resultados foram menores quando o resíduo do maracujá foi utilizado como substrato: concentração de biomassa de 0,1380 g.L⁻¹, redução da tensão superficial de 17,4% e índice de emulsificação de 54%.

PALAVRAS-CHAVE: Biossurfactante, *Bacillus subtilis*, Fermentação submersa, Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT: Biosurfactants are surface-active compounds derived from microorganisms

and offer several advantages when compared to synthetic surfactants, such as biodegradability, low toxicity and the possibility of being produced from renewable resources. However, despite these advantages, the cost of the biosurfactant production process is high. An alternative to this is to use substrates with low added value, such as agroindustrial waste, since substrate costs can reach up to 30% of the process costs. In this study, papaya and passion fruit wastes were used as substrates for the biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. The submerged fermentation was performed on an orbital shaker at 37 °C and 200 rpm for 96 h. The strain was well adapted to the substrate using papaya wastes with a maximum concentration of 1.0660 g.L⁻¹, 25.5% of surface tension reduction and emulsification index of 61.54%. These results were lower when the passion fruit waste was used as substrate: biomass concentration of 0.1380 g.L⁻¹, surface tension reduction of 17.4% and emulsification index of 54%.

KEY WORDS: Biosurfactant, *Bacillus subtilis*, Submerged fermentation, Agroindustrial wastes.

1 | INTRODUÇÃO

Surfactantes ou tensoativos são moléculas anfipáticas, constituídas por uma porção apolar (hidrofóbica) e uma porção polar (hidrofílica), onde a porção hidrofóbica é geralmente formada por uma ou duas cadeias carbônicas, enquanto a porção hidrofílica pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (EHRHARDT, 2015; ROCHA, 2017). Apesar de serem formados por duas regiões de solubilidades diferentes ligadas uma a outra, estas porções possuem distância suficiente para se comportarem de maneira independente.

A palavra surfactante se origina da expressão “surface active agent” (agente de atividade superficial) e devido a sua estrutura são capazes de reduzir as tensões interfaciais e superficiais ao se adsorverem nas interfaces líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido, formando microemulsões (FERREIRA *et al.*, 2018). Essa característica permite tornar miscível duas fases imiscíveis, como água e óleo por exemplo, e possibilita a estes compostos uma ampla gama de aplicações industriais que envolvem detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade umectante, solubilização e dispersão de fases (ROCHA, 2017).

As características dos surfactantes os tornam compostos químicos amplamente utilizados em produtos como detergentes, petroquímicos, cosméticos, tintas, cerâmica, alimentos, tratamento de couros e têxteis, formulações farmacêuticas, óleos lubrificantes, entre outros (DALVIN, 2011). No entanto, apesar dessas propriedades, 70-75% dos surfactantes químicos consumidos por países industrializados são de origem petroquímica, não são biodegradáveis e podem ser tóxicos para o ecossistema.

Em virtude da crescente preocupação ambiental, tem-se buscado por produtos mais brandos, biodegradáveis, com baixa ou nenhuma toxicidade e que possam ser

produzidos através de recursos renováveis. Os compostos de origem microbiana denominados biossurfactantes são excelentes alternativas a esta problemática uma vez que, além de possuírem essas características, exibem propriedades tensoativas com alta capacidade emulsificante e redução da tensão superficial (KAKINUMA *et al.*, 1969; SOO *et al.*, 2004).

Uma ampla variedade de biossurfactantes é atualmente conhecida e esta diversidade atribui-se ao fato de que cada microrganismo é capaz de produzir um surfactante diferente com características específicas. Em virtude dessa multiplicidade, os biossurfactantes são classificados de acordo com suas estruturas químicas ou pela origem microbiana diferente dos surfactantes sintéticos que são classificados de acordo com a natureza de seu grupo hidrofílico (EHRHARDT, 2015; MAIER, 2003). A Tabela 1 demonstra as principais classes de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO
Glicolipídios	
-ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i>
	<i>T. apícola</i>
-trealolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
-peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
-viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-serraventina	<i>Serratia marcescens</i>
-subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
-surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
-gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
-polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
-ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
-lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
-fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
-emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-liposan	<i>Candida lipolytica</i>
-carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>

Surfactante particulados	
-vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-células	Várias bactérias

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Fonte: DESAI & BANAT (1997).

A capacidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial e interfacial utilizando baixas concentrações é talvez sua propriedade mais explorada (EHRHARDT, 2015; FARIA, 2010). Além disso, características como tolerância a temperatura, pH e força iônica também colocam os biossurfactantes em vantagem sobre os surfactantes sintéticos e também determinarão suas aplicações no setor industrial. Essas características permitem a utilização desses compostos em ambientes com condições mais drásticas e conseqüentemente possibilita uma ampliação do seu espectro de aplicações (EHRHARDT, 2015).

Em virtude da sua diversidade química, da característica anfifílica e de propriedades como biodegradabilidade, baixa toxicidade e compatibilidade ambiental, os biossurfactantes se destacam como moléculas aplicáveis em diferentes áreas das quais pode-se citar: biorremediação, recuperação melhorada do petróleo, medicina como agentes antivirais, antitumorais e antimicrobianos, dispersante na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, na nanotecnologia como agentes de superfície na dispersão de nanotubos de carbono e também podem interagir com metais pesados, contribuindo para uma melhora na degradação de contaminantes químicos (FARIA, 2010; SEN, 2010).

A composição e as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes são influenciadas pela natureza do substrato, concentração de íons no meio de cultivo, além das condições e da idade da cultura (GEORGIU *et al.*, 1992; KRIEGER *et al.*, 2009). Algumas bactérias produtoras de biossurfactantes incluem: *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Arthrobacter paraffineus*. Alguns fungos também têm capacidade de produzir biossurfactantes incluindo as leveduras *Torulopsis sp* e *Candida sp* (BUENO *et al.*, 2010; CHRISTOFI E IVSHINA, 2002).

Dentre as bactérias produtoras de surfactantes naturais encontra-se o *Bacillus subtilis* que é uma das principais espécies de microrganismos produtora de biossurfactantes lipoprotéicos como iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina, bacilomicina e surfactina (BARROS *et al.*, 2007). A maioria dos biossurfactantes excretados por linhagens de *Bacillus subtilis* pertencem à classe dos lipopeptídios cíclicos, que geralmente são formados por um anel contendo sete aminoácidos e por uma cadeia de ácido graxo de conformação e tamanho de cadeia variável (BUGAY, 2009; ROCHA, 2017).

O *Bacillus subtilis* é responsável pela produção da surfactina, o biossurfactante

mais potente já caracterizado (EHRHARDT, 2015). A surfactina consiste em um heptapeptídeo cíclico unido a uma cadeia de ácido graxo contendo 12 a 16 átomos de carbono e possui propriedades surfactantes poderosas e uma excelente estabilidade frente a variações de pH, temperatura e força iônica (DESAI E BANAT, 1997). Estas características interessantes têm promovido o interesse em pesquisas com a surfactina e uma ampla variedade de isoformas e homólogos têm sido encontrados (BUGAY, 2009). A Figura 1 exibe a estrutura química da surfactina.

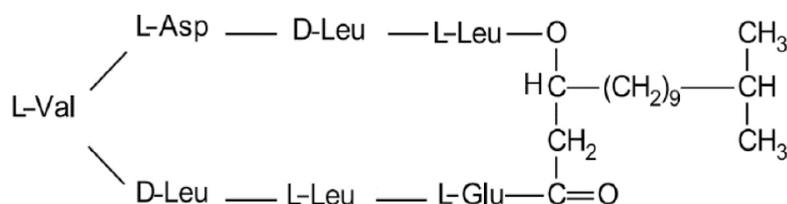


Figura 1. Estrutura química da surfactina (DESAI & BANAT, 1997).

De acordo com o relatório publicado pela “Grand View Research Incorporation” (2015), o mercado global de biossurfactantes atingiu cerca de 344.068,40 toneladas em 2013 e deverá chegar a 461.991,67 toneladas até 2020, crescendo a uma taxa anual composta de 4,3% entre os anos de 2014 e 2020. No entanto, apesar da expectativa no crescimento do mercado de biossurfactantes, estes compostos não competem economicamente com surfactantes sintéticos devido aos altos custos do processo associados a métodos ineficientes de recuperação do bioproduto e ao uso de substratos onerosos, que representam cerca de 10 a 30% do custo total da produção (LOBATO et al., 2013; ROCHA, 2017).

Uma alternativa para reduzir os custos referentes ao processo de produção dos biossurfactantes é utilizar substratos alternativos que tenham equilíbrio nutricional e que sejam capazes de fornecer condições eficientes de crescimento do microrganismo e de síntese do bioproduto de interesse. Nesse sentido, os subprodutos da atividade agroindustrial são ótimas fontes de substrato para a produção de biossurfactantes e seu uso pode diminuir os problemas ambientais causados pelo descarte inadequado, bem como os custos associados aos tratamentos de efluentes (GALLERT E WINTER, 2002; MAKKAR E CAMEOTRA, 2002; MUKHERJEE E DAS, 2005). Assim, a utilização de resíduos agroindustriais além de agregar valor a esses materiais, também contribui para a sustentabilidade de sua cadeia econômica (ROCHA, 2017).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactante por uma cepa de *Bacillus subtilis* utilizando cascas de mamão e cascas de maracujá como substratos alternativos de baixo custo. A eficiência do processo foi avaliada pelo crescimento celular, pela redução da tensão superficial e pelo índice de emulsificação do biossurfactante produzido ao longo das 96h de fermentação.

2 | METODOLOGIA

2.1 Manutenção celular

A cepa de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 utilizada neste estudo foi cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. A cepa foi mantida em meio de ágar Luria-Bertani (modificado). O meio modificado foi composto por 10,0 g.L⁻¹ de triptona; 5,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 5,0 g.L⁻¹ de NaCl e 20,0 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 6,8 utilizando NaOH 1M ou HCl 1M e em seguida este foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar em tubos inclinados que, em seguida, foram incubados a 37°C por 24 horas e armazenados a 4°C. Este procedimento foi repetido mensalmente para manutenção da cepa.

2.2 Pré-inóculo e inóculo

Os caldos utilizados como pré-inóculo e inóculo, proposto por Bugay (2009) modificado, apresentaram a mesma composição: 20,0 g.L⁻¹ de glicose; 3,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 7,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e 1,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Em seguida, corrigiu-se o pH destes meios para 6,8 utilizando NaOH 1M ou HCl 1M. O pré-inóculo foi preparado através da transferência de três alçadas da cultura do tubo inclinado para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio e depois levado a uma incubadora com agitação orbital a 37°C e 200 rpm durante 6 horas.

Para o inóculo, utilizou-se um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Nesta etapa, retirou-se do pré-inóculo uma alíquota correspondente a 10% (v/v) do inóculo (5 mL) e transferiu-se para o Erlenmeyer que também foi incubado sob agitação orbital a 37 °C e 200 rpm para cerca de 16 horas.

2.3 Preparo do substrato

Os resíduos de mamão e de maracujá utilizados neste estudo foram obtidos da Brasfrut®, indústria de processamento de frutas localizada na cidade de Feira de Santana, Bahia. Os resíduos foram homogeneizados com água destilada em liquidificador doméstico de 2 L na concentração de 250 g.L⁻¹ conforme proposto por Souza *et al.*, 2012. Em seguida, filtrou-se e centrifugou-se a mistura obtida a 10.000 rpm e 25 °C por 10 minutos até a remoção de todas as partículas sólidas e obtenção do extrato aquoso (caldo), que foi utilizado neste estudo como substrato na fermentação. Utilizou-se Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo, assim como no inóculo.

2.4 Produção de biossurfactante

A produção ocorreu em triplicata por fermentação submersa em incubadora

orbital a 37 °C e 200 rpm durante 96 horas. As amostras foram coletadas em intervalos regulares (12 em 12 horas) para monitoramento da concentração celular, da variação da tensão superficial e do índice de emulsificação. A medida que as amostras eram coletadas, estas eram centrifugadas a 10.000 rpm, 25 °C por 10 minutos para separar o *pellet* (que contém a biomassa, as células) do sobrenadante (que contém o biossurfactante).

2.5 Crescimento e produtividade celular

A concentração celular foi determinada pelo método da massa seca (TRÍBOLI, 1989). Neste método, transferiu-se 50 mL das amostras para tubos previamente pesados e depois centrifugou-se a 10.000 rpm, 25 °C por 10 minutos. O corpo de fundo formado (*pellet*) foi utilizado para determinar a concentração de células e o sobrenadante foi separado para análises posteriores. O *pellet* foi lavado com água destilada e centrifugado 3 vezes para remoção de resíduos solúveis do sobrenadante. Após a lavagem, as amostras foram colocadas em estufa para secagem a 65 °C por 24 horas até peso constante. Decorrido esse tempo, os tubos foram colocados em dessecador por 5 minutos e então pesados. A concentração celular (g.L⁻¹), [X], foi expressa de acordo com a Equação 1.

$$[X] = \frac{m_{seco} - m_{vazio}}{50} \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

m_{seco} = massa do tubo contendo as células pós-secagem (g);

m_{vazio} = massa do tubo vazio (g).

A produtividade celular (g.L⁻¹.h⁻¹), P_X , foi determinada pela Equação 2 descrita por Schmidell *et al.* (2001).

$$P_X = \frac{X_m - X_o}{t_f} \quad (2)$$

Onde:

X_m = concentração celular máxima (g.L⁻¹);

X_o = concentração inicial de células (g.L⁻¹);

t_f = tempo total da fermentação (h).

2.6 Tensão superficial

A tensão superficial do caldo fermentado isento de células foi monitorada a cada 12 horas pelo método do anel Du Noüy utilizando tensiômetro Kruss K20 a temperatura de ±25 °C (KUYUKINA *et al.*, 2001).

2.7 Índice de emulsificação

Os caldos fermentados isentos de células (sobrenadantes) foram misturados a compostos hidrofóbicos - óleo de soja, gasolina e diesel - em tubos de ensaio na proporção de 4:6, respectivamente, e homogeneizados em vórtex sob velocidade máxima durante 1 minuto. Os tubos foram então mantidos em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas e no final do tempo foram medidas a altura da camada emulsionada e a altura total dos líquidos no tubo utilizando uma régua. O índice de emulsificação foi obtido pela Equação 3 descrita por Cooper e Goldenberg (1987).

$$IE_{24} (\%) = \frac{AE}{AT} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

IE_{24} = índice de emulsificação após 24 h (%);

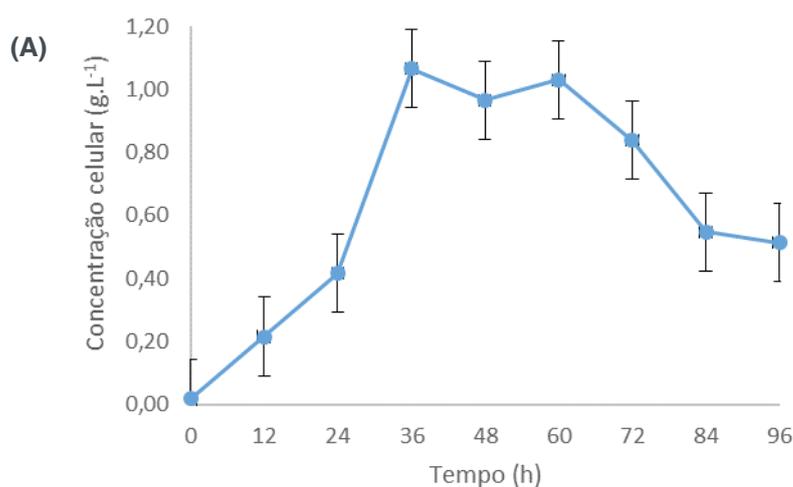
AE = altura da camada emulsionada (cm);

AT = altura total da camada de líquidos (cm).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento e produtividade celular

O *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 apresentou maior crescimento no meio utilizando o extrato aquoso da casca de mamão como substrato do que no meio utilizando o resíduo aquoso de maracujá, conforme ilustrado nas Figuras 2A e 2B.



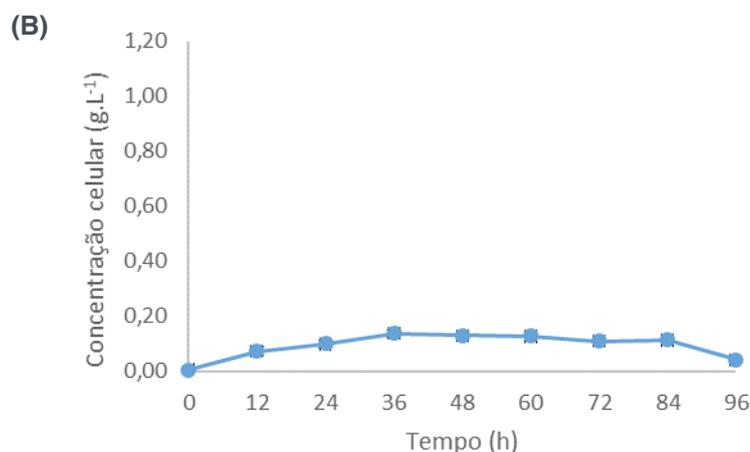


Figura 2. Crescimento celular utilizando o caldo proveniente (A) das cascas do mamão e (B) das cascas do maracujá como substrato.

A concentração celular máxima para ambos os substratos ocorreu em 36h de cultivo, sendo 1,0660 g.L⁻¹ utilizando os resíduos do mamão e 0,1380 g.L⁻¹ para o caldo produzido a partir das cascas do maracujá. A produtividade utilizando as casca do mamão foi de 0,011 g.L⁻¹.h⁻¹ e para as cascas do maracujá foi de 0,001g.L⁻¹.h⁻¹. Desta forma, o substrato produzido a partir dos resíduos de mamão demonstrou ser uma melhor fonte de carbono para o crescimento de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 do que o substrato obtido a partir dos resíduos de maracujá.

Silva *et al.* (2015) estudaram o crescimento de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 por 48h utilizando glicose e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, e obtiveram concentração celular máxima de 0,4 g.L⁻¹ e produtividade de 0,008 g.L⁻¹.h⁻¹. Os resultados obtidos no presente estudo referente ao cultivo com a casca de mamão foram superiores ao da pesquisa mencionada, o que demonstra que a cepa utilizada se adequou bem ao meio complexo proposto. Os resultados obtidos para o substrato preparado a partir dos resíduos de maracujá foram inferiores ao obtido por Silva *et al.* (2015).

3.2 Tensão superficial

A medida da tensão superficial ao longo do tempo é um método indireto para monitorar a produção de biossurfactante sendo, desta forma, de grande importância no estudo desse bioproduto. À medida que o microrganismo cresce, o biossurfactante é sintetizado e excretado no meio, reduzindo a tensão superficial (LIMA *et al.*, 2016).

As Figuras 3A e 3B demonstram o comportamento da tensão superficial para os caldos preparados a partir dos resíduos do mamão e a partir dos resíduos do maracujá, respectivamente.

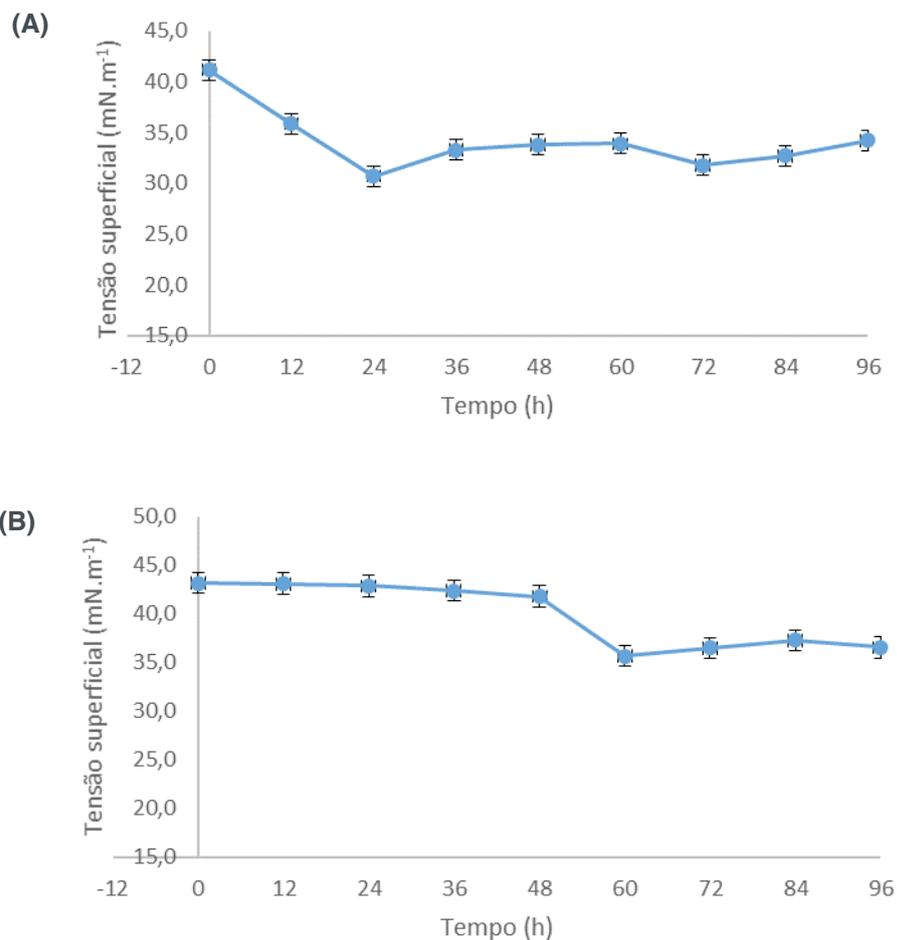


Figura 3. Curvas da tensão superficial ao longo das 96h de fermentação para os substratos preparados (A) a partir dos resíduos do mamão e (B) a partir dos resíduos do maracujá.

Analisando o comportamento da tensão superficial para a curva do mamão (Figura 3A), observou-se que houve uma diminuição de $41,2 \text{ mN.m}^{-1}$ para $30,7 \text{ mN.m}^{-1}$, o que significa aproximadamente 25,5% de redução em 24h de cultivo. Quando observado o comportamento desta variável para a curva do maracujá (Figura 3B), observou-se uma diminuição de $43,2 \text{ mN.m}^{-1}$ para $35,7 \text{ mN.m}^{-1}$ em 60h de cultivo, o que significa uma redução de cerca de 17,4%. Estes valores indicam resultados favoráveis quando utilizado o substrato produzido a partir das cascas do mamão, uma vez que a literatura indica que os biossurfactantes efetivos devem reduzir a tensão superficial do meio em pelo menos 20% (EHRHARDT, 2015). Resultado semelhante não foi obtido para o substrato produzido a partir dos resíduos de maracujá.

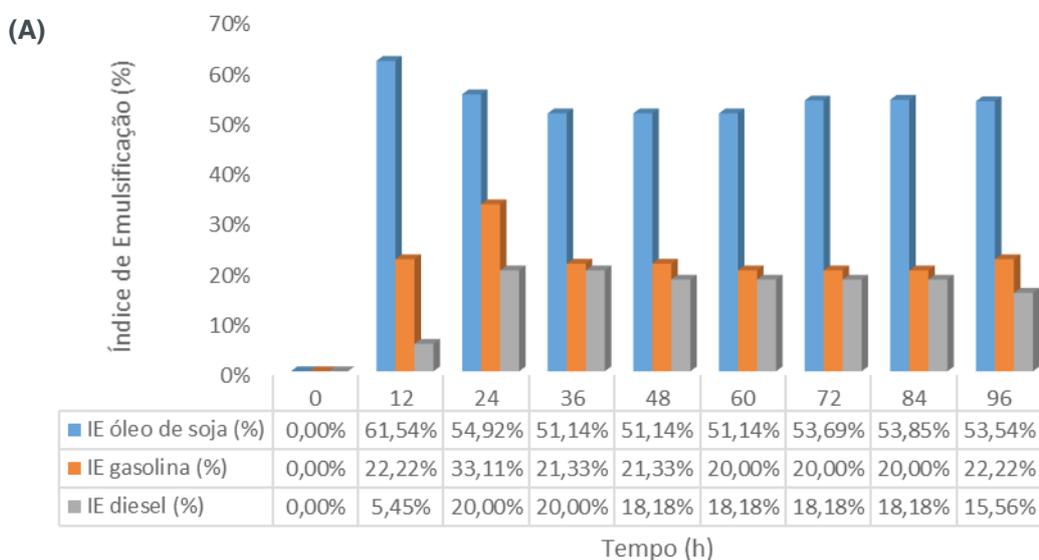
Um estudo realizado por Rocha (2007) utilizando uma cepa *Bacillus subtilis* (LAMI007) e caldo nutriente e suco de caju diluído a diferentes concentrações (10% a 50%) como substratos mostrou que não houve produção de biossurfactante, uma vez que não ocorreu crescimento celular e alteração da tensão superficial durante as 72h de fermentação, indicando que o meio utilizado necessita de suplementação para sintetizar o bioproduto. No presente estudo, o resíduo de mamão foi homogeneizado a uma concentração de 25% (m/v) e ocorreu crescimento celular e redução da tensão superficial, ou seja, o meio ofereceu nutrientes suficientes para a formação do

bioproduto. Rocha (2007) também realizou a suplementação do suco de caju diluído com fontes de nitrogênio e verificou que houve uma redução na tensão superficial de cerca de 11,94% após 48 h de cultivo, um valor menor do que o obtido no presente trabalho.

Estudos conduzidos por Ehrhardt (2015) utilizando uma linhagem de *Bacillus subtilis* e resíduos de abacaxi como substrato para produção de biossurfactante mostraram uma redução na tensão superficial de 64,54 mN.m⁻¹ para 48,25 mN.m⁻¹ após 24h, o que corresponde a uma diminuição de cerca de 25,2%, valor semelhante ao encontrado no presente estudo quando utilizado o resíduo do mamão como substrato. No entanto, mais uma vez, quando comparado ao resíduo do maracujá, a pesquisa realizada por Ehrhardt (2015) obteve melhor resultado.

3.3 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação também prevê a formação de biossurfactante de forma indireta, fornecendo resultados bons e rápidos desta produção, além de permitir avaliar a estabilidade do biossurfactante quanto à manutenção da emulsão. As Figuras 4A e 4B demonstram o índice de emulsificação dos biossurfactantes produzidos durante as 96h de cultivo para os resíduos de mamão e maracujá, respectivamente, utilizando óleo de soja, gasolina e diesel como compostos hidrofóbicos.



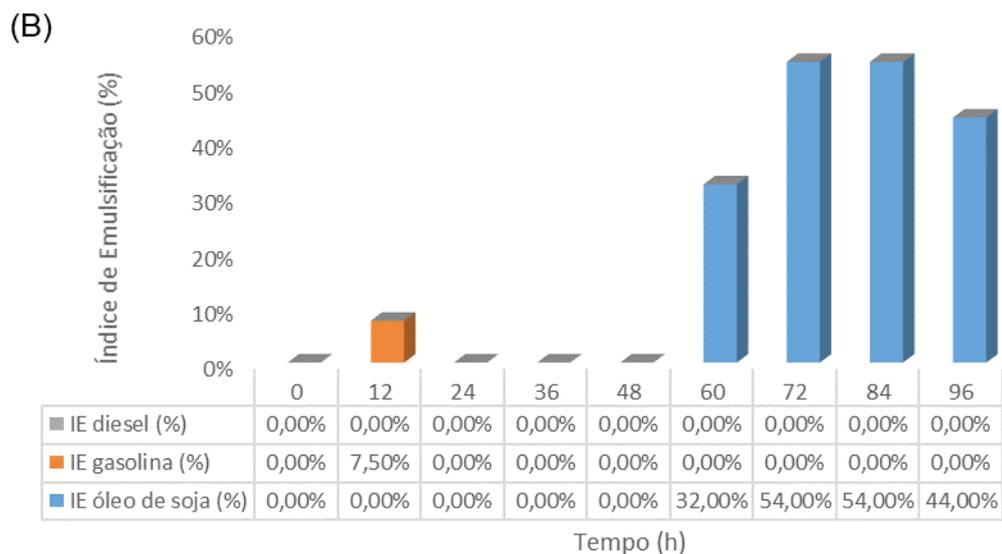


Figura 4. Índices de emulsificação para os substratos utilizando (A) resíduos do mamão e (B) resíduos do maracujá.

O valor máximo obtido dos índices de emulsificação para ambos os substratos foi com óleo de soja. Utilizando a casca de mamão foi obtido 61,54% em apenas 12h de cultura e com casca de maracujá foi obtido 54% após 72h de cultura. Essa boa emulsificação utilizando o óleo de soja sugere um potencial uso do biossurfactante produzido neste estudo na indústria alimentícia como agente emulsionante, conferindo a formação da consistência e a textura desejada dos alimentos, bem como a dispersão de fases (BANAT *et al.*, 2000).

Em ambos os casos, os índices de emulsificação foram maiores que o encontrado por Silva *et al.* (2015) que obteve um resultado de 34,5% em 24h de cultivo, utilizando óleo de girassol como composto hidrofóbico. Os índices de emulsificação obtidos estão em concordância com as tensões superficiais observadas nas Figuras 3A e 3B, uma vez que os maiores índices de emulsificação são observados quando existem quedas acentuadas nos valores das tensões superficiais, conforme esperado.

A diferença entre o comportamento do índice de emulsificação no diesel e na gasolina quando utilizado o substrato proveniente das cascas do mamão, pode sugerir uma melhor emulsificação do biossurfactante produzido com hidrocarbonetos de cadeia curta, conforme já explicitado por Barros *et al.* (2008), mas outros estudos são necessários para essa análise.

4 | CONCLUSÕES

A cepa de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 obteve melhor resultado quando o mamão foi utilizado como substrato, com crescimento celular máximo de 1,0660 g.L⁻¹ e índice de emulsificação em óleo de soja de 61,54%. Utilizando a gasolina e o diesel foram obtidos 33,11% e 20% de emulsificação, respectivamente. O desempenho do

processo fermentativo foi avaliado pela produtividade em biomassa, obtendo 0,011 g.L⁻¹.h⁻¹ para o substrato utilizando resíduos do mamão. Este valor foi cerca de 1,4 vezes maior do que o encontrado na literatura para a mesma linhagem. Além disso, o resíduo de mamão foi eficaz como fonte de substrato na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, uma vez que causou uma redução significativa na tensão superficial do meio.

Os valores obtidos para os resíduos de maracujá não foram significativos, uma vez que houve uma baixa redução da tensão superficial, 17,4%, um baixo crescimento celular, 0,1380 g.L⁻¹, e um índice de emulsificação razoável somente após 72h de cultivo, tempo elevado para uma aplicação industrial.

Os resultados sugerem que o resíduo do mamão pode ser usado como substrato para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*. Além disso, a utilização desses resíduos traz uma oportunidade para reduzir a poluição ambiental causada por sua deposição inadequada no processamento industrial, bem como minimiza os custos dos processos com tratamento de efluentes.

REFERÊNCIAS

- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicação em Alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.
- BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33; n. 7; p. 1572-1577, 2010.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their comercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- FARIA, A. F. **Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) -

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FERREIRA, G. F. D.; SOUZA, D. R. Q.; LIMA, R.; LOBATO, A. K. C. L.; SILVA, A. C. M.; SANTOS, L. C. L. Novel glycerin-based microemulsion formulation for enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 167, p. 674-681, 2018.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Review Article**, v. 89, p. 483-496, 2002.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-Active Compounds from Microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GRAND VIEW RESEARCH. **Biosurfactants Market Analysis By Product (Rhamnolipids, Sophorolipids, MES, APG, Sorbitan Esters, Sucrose Esters) And Segment Forecast To 2020**. 195 p. Relatório. São Francisco, CA, 2015.

KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 973-976, 1969.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: SEN, R. (Org) **Biosurfactants**. Georgetown: Lands Bioscience, 2009.

KUYUKINA M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.

LIMA, J. M. S.; PEREIRA, J. O.; BATISTA, I. H.; NETO, P. Q. C.; SANTO, J. C.; ARAÚJO, S. P.; PANTOJA, M. C.; MOTA, A. J.; AZEVEDO, J. L. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 24, p. 1217-1223, 2016.

LOBATO, A. K. C. L.; ALMEIDA, A. F.; BEZERRA, M. S.; JÚNIOR, L. M. B.; SANTOS, L. C. L.; MACEDO, G. R. Biosurfactant production from industrial residues using microorganisms isolated from oil wells. **International Review of Chemical Engineering**, v. 5, n. 4, p. 310-316, 2013.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-116, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An Update to the Use of Unconventional Substrates for Biosurfactant Production and their New Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MUKHERJEE, A. K.; DAS, L. K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 479-489, 2005.

ROCHA, M. V. P. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ROCHA, P. M. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

SEN, R. **Biosurfactants**. New York, NY: Springer-Verlag New York, 2010.

SCHIMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial. São Paulo, SP: Edgard Blucher, v. 2, 2001.

SILVA, R. K. P.; SANTOS, S. F. M.; ALMEIDA, A. F.; DIAS, P. V. S.; COSTA, M. H. J. Avaliação do crescimento e produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. In: I Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2015, Campina Grande. **Resumos...** Campina Grande: III Workshop de Engenharia de Petróleo, 2015.

SOO, E. T.; SALLEH, A. B.; BASRI, M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; KAMARUDDIN, K. Response surface methodological study on lipase – catalyzed synthesis of amino acid surfactants. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1511-1518, 2004.

SOUZA, O.; SCHULZ, M. A.; FISCHER, G. A. A.; WAGNER, T. M.; SELLIN, N. Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 915-921, 2012.

TRÍBOLI, E. P. D. R. **Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica**. 52 f. Apostila – Laboratório de Bioquímica e Engenharia de Alimentos, Escola de Engenharia de Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 1989.

ESTUDO DO REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA CACAUEIRA.

Rhuany de Oliveira Silva

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharia.

Alegre – Espírito Santo

Iara Rebouças Pinheiro

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharia.

Alegre – Espírito Santo

Isabela Nascimento Tavares Ferreira

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharia.

Alegre – Espírito Santo

RESUMO: A indústria cacaueira em seu processo de produção gera um montante considerável de resíduos sólidos constituídos principalmente pela casca do fruto. O objetivo desse trabalho foi caracterizar quimicamente e hidrolisar em meio ácido o resíduo composto pela casca do fruto do cacaueiro, visando a produção de açúcares fermentescíveis. Inicialmente foi realizada a caracterização do resíduo de cacau visando determinar a sua composição. Os resultados mostraram uma significativa presença de celulose, aproximadamente 32,46%, o que viabiliza a realização da hidrólise para posterior fermentação. Em seguida, foram realizados experimentos de hidrólise com H_2SO_4 diluído nas concentrações de 0,20%, 0,34% e 0,48% (m/v). Os resultados obtidos mostraram que as

diferentes concentrações de ácido conduziram a diferentes teores de açúcar no hidrolisado e que a condição de hidrólise mais favorável para a obtenção de açúcares redutores foi a 0,34% (m/v) de H_2SO_4 , resultando em 13,40 gramas/L de açúcares redutores totais (ART). Portanto a biomassa lignocelulósica do cacau se mostra como uma fonte promissora de matéria prima para posterior transformação em bioetanol.

PALAVRA CHAVE: Resíduos Lignocelulógicos, Resíduos do cacau, Hidrólise ácida.

ABSTRAT: The cocoa industry in its production process generates a considerable amount of solid waste mainly constituted by the fruit peel. The objective of this work was to chemically characterize and hydrolyze in acid medium the residue composed of the cocoa fruit peel, aiming the production of fermentable sugars. Initially the characterization of the cocoa residue was carried out in order to determine its composition. The results showed a significant presence of cellulose, approximately 32.46%, which makes it possible to carry out the hydrolysis for subsequent application in fermentation. Then, hydrolysis with diluted H_2SO_4 at concentrations of 0.20%, 0.34%, 0.48% m/v were carried out. The results show that different acid concentrations resulted in different levels of sugar in the hydrolyzed material and the hydrolysis conditions more favorable to obtain

reducer sugars was 0.34% (m/v) H_2SO_4 , resulting in 13.40 g/L of total reducing sugars (ART). Therefore the lignocellulosic biomass of cocoa seems to be a promising source of later raw material for transformation into bioethanol.

KEYWORDS: Lignocellulosic residues, Cocoa residues, Acid hydrolysis

1 | INTRODUÇÃO

A agroindústria do cacau gera um montante considerável de resíduos sólidos orgânicos, constituído principalmente pela casca do fruto que representa 80% da sua composição (MORORÓ, 2007). Um fruto produz em média 50 g de amêndoas secas e 400 g de casca (FREIRE et al., 1990), isso significa que para produzir uma tonelada de amêndoas são geradas aproximadamente oito toneladas de cascas frescas. O Brasil é o 4º maior produtor mundial de cacau, no ano de 2017 produziu mais de 214,3 mil toneladas de cacau (BRASIL, 2015; IBGE, 2018), ou seja, foi produzido no mesmo período cerca de 1.714.400 toneladas de casca de cacau fresca. Proveniente de espécies vegetais se apresenta como uma matéria-prima de fonte renovável, de baixo custo e com grande disponibilidade, podendo ainda, ser efetivamente convertida em açúcares fermentescíveis (MARTÍN et al., 2007).

Os materiais lignocelulósicos são insumos resultantes das culturas vegetais, sendo esses constituídos por um conjunto de polímeros formados por carboidratos denominado lignocelulose, que por sua vez é composta predominantemente de celulose, hemicelulose e lignina (MALHERBE; CLOETE, 2002; SAKAR, et al., 2012). O processo de produção do etanol utilizando como matéria-prima materiais lignocelulósicos se caracteriza por necessitar de duas etapas prévias: O pré-tratamento e a hidrólise. O pré-tratamento visa promover a alteração ou remoção da hemicelulose e da lignina, além de propiciar a diminuição da interação entre os componentes da estrutura lignocelulósica, a fim de aumentar a vulnerabilidade da celulose as próximas etapas, já a hidrólise visa a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da celulose e da hemicelulose (BNDES; CGEE, 2008; SANTOS et al., 2012).

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente e hidrolisar em meio ácido o resíduo composto pela casca do fruto do cacau, visando um reaproveitamento ambientalmente correto para os resíduos provenientes do processamento do fruto do cacau.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-Prima

Os resíduos lignocelulósicos foram cedidos pela Agroindústria Chocolates Espírito Santo, situada no município Iconha/ES.

2.2 Caracterização Química da Biomassa do Cacau

A casca do fruto do cacau foi caracterizada conforme a metodologia adaptada Morais et al., 2010. Foram determinados os teores de umidade, cinzas, hemicelulose, celulose, extrativos e lignina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Pré-Tratamento da Biomassa do Cacau

As cascas do cacau foram secas em estufa (105°C, 2horas) e trituradas. A casca passou por um pré-tratamento químico com H₂O₂ com concentração de 7,355% (v/v) afim de extrair a lignina presente. O pH do meio foi ajustado com NaOH para 11,5 e a temperatura a 50°C. Ao final do processo a casca foi lavada 12 vezes consecutivas e seca em estufa (RABELO, 2007).

2.4 Hidrólise Ácida

A metodologia de hidrólise com ácido diluído foi adaptada do trabalho de Gurgel, 2010, empregando as diferentes concentrações de H₂SO₄ a (0,20%, 0,34%, 0,48% m/v). As reações foram feitas em triplicata utilizando as amostras de cascas pré-tratadas com H₂O₂. Finalizada a hidrólise, as amostras foram encaminhadas para determinação de açúcares redutores pelo método DNS (VASCONCELOS et al., 2013).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Componente	Casca <i>in Natura</i> (%)	Casca Pré-tratada (%)
Umidade	7,30 ± 0,47	8,54 ± 0,18
Lignina Insolúvel	18,24 ± 0,75	11,25 ± 0,69
Celulose	32,46 ± 1,34	75,48 ± 3,31
Hemicelulose	20,3 ± 1,59	1,92 ± 3,36
Extrativos	30,56 ± 1,35	8,55 ± 2,17
Cinzas	7,10 ± 0,13	2,56 ± 0,008

Tabela 1. Composição química e bromatológica da casca do fruto do cacau.

Conforme os dados detalhados na Tabela 1, a casca do cacau apresentou elevado teor de celulose, sendo 32,46% *in natura* e 75,48% após pré-tratada. O pré-tratamento com H₂O₂ se mostrou eficiente ao diminuir os teores de hemicelulose e lignina para respectivamente 1,92% e 11,25%.

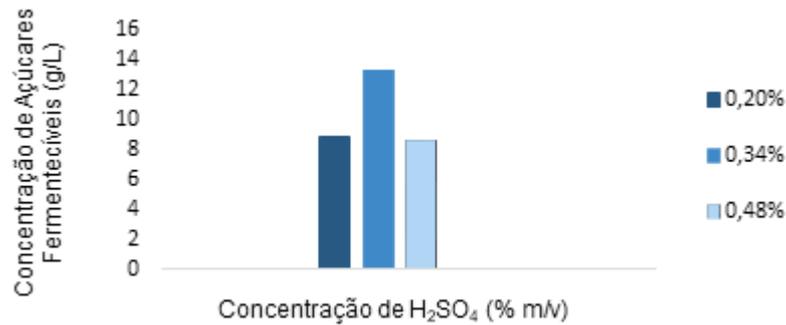


Figura 1. Resultados das concentrações de açúcares fermentescíveis obtidos na hidrólise ácida da casca do cacau sob três concentrações distintas de massa de H₂SO₄

A hidrólise empregando ácido diluído apresentou resultados satisfatórios de extração de açúcares, com base na Figura 1, observou-se diferença entre a quantidade de açúcares obtido na hidrólise com as distintas concentrações de H₂SO₄, realizada a 120°C por 90 min. A condição de hidrólise ácida utilizando a concentração de 0,34% (m/v) se mostrou a mais eficiente dentre as condições testadas, produzindo 13,40 g/L de açúcares fermentescíveis, obtendo uma eficiência média em torno de 40%, valor este que se encontra próximo aos apresentados na literatura para outros tipos de biomassas lignocelulósicas que objetivam à produção de etanol. Considerando que houve uma efetiva produção de açúcares fermentescíveis, o hidrolisado pode ser encaminhado para a etapa de fermentação alcoólica.

4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento indicam a viabilidade da utilização da biomassa composta pela casca do cacau como matéria-prima para a produção de bioetanol, devido a presença de uma quantidade considerável de celulose (75,48% após pré-tratada), a qual foi hidrolisada com H₂SO₄ (0,34%), obtendo-se uma eficiência em torno de 40% na hidrólise.

REFERÊNCIAS

BNDES - Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social; CGEE. - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BRASIL, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bahia retoma exportações de cacau após vencer a vassoura-de-bruxa**. 2015. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-emprego/2015/11/bahia-retoma-exportacoes-de-cacauapos-vencer-a-vassoura-de-bruxa>. Acesso em: 15/04/2016

FREIRE, E. S.; ROMEU, A. P.; PASSOS, F. V.; PASSOS, F. L.; MORORO, R. C.; SCHAWAN, R.F.; LLAMOSAS, A.; CHEPOTE, R. E.; SANTANA, M. B. M.; FERREIRA, H. I. S. **Aproveitamento de resíduos e subprodutos da pós-colheita do cacau**. Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC, 24p. 1990.

GURGEL, L. V. A., **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**, 315 f., Tese (Doutorado em Ciências – Físico-Química), Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola – LSPA**. 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: 06, março, 2018

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. **Environmental Science and Technology**. v. 1, p.105-114, 2002.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 426–432, 2007

MORAIS, J. P. S; ROSA, M.F; MARCONCINI, J.M. **Procedimentos para Análise Lignocelulósica**. Documentos 236, Embrapa Algodão, Campina Grande-PB, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/883400/1/DOC236.pdf>

MORORÓ, R. C. **Aproveitamento dos Derivados do cacau, Subprodutos e Resíduos do Cacau**. In: Raul René Valle. (Org.). Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro. 1ed.Itabuna, 2007, v. 1, p. 204-260.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acessado em: 29/05/2016.

SANTOS, J. R. A.; LUCENA, M.S.; GUSMÃO, N.B.; GOUVEIA, E.R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEADA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p 584-588, 2012.

SARKAR, N.; KUMAR Ghosh, S.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

VASCONCELOS, N. M. de; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

BIOPRODUCTS FROM *Trichoderma harzianum* AS INDUCER OF RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEANS

Emanuele Junges

Federal Institute of Education, Science and
Technology Farroupilha

São Vicente do Sul – Rio Grande do Sul

Marlove Fátima Brião Muniz

Department of Plant Protection - Federal
University of Santa Maria

Santa Maria – Rio Grande do Sul

Ângela Diniz Campos

Embrapa Clima Temperado

Pelotas – Rio Grande do Sul

Thiarles Brun

Department of Chemical Engineering - Federal
University of Santa Maria

Santa Maria – Rio Grande do Sul

Cleudson José Michelin

Federal Institute of Education, Science and
Technology Farroupilha

São Vicente do Sul – Rio Grande do Sul

Marcio Antônio Mazutti

Department of Chemical Engineering - Federal
University of Santa Maria

Santa Maria – Rio Grande do Sul

RESUMO: *Trichoderma harzianum* é um organismo de controle biológico com ação em vários patossistemas. No entanto, sua eficácia é afetada por problemas na formulação dos produtos e interações com a planta ou patógeno. Diante disso, o objetivo deste estudo

foi comparar a indução de resistência e controle de antracnose em feijão (*Phaseolus vulgaris*) causada por células vivas de *Trichoderma harzianum* e também pelos metabólitos produzidos na fermentação submersa. Os bioprodutos foram aplicados via tratamento de sementes e também via aplicação foliar. Avaliações realizadas em plantas apresentaram aumento significativo na atividade específica da peroxidase e β -1,3-glucanase após a inoculação do patógeno, indicando a ativação da resistência induzida. As respostas de indução não afetaram o acúmulo de plantas de massa seca. O uso de *T. harzianum* na forma de esporos vivos ou filtrado de cultura reduziu a severidade da doença e tem o potencial de controlar a antracnose do feijoeiro e/ou integrar programas de manejo de doenças.

PALAVRAS-CHAVE: *Phaseolus vulgaris*, β -1,3-glucanase, Peroxidase, Controle Biológico

ABSTRACT: *Trichoderma harzianum* is a biological control organism with action in several pathosystems. However, its effectiveness is affected by problems in the formulation of products and interactions with the plant or pathogen. Taking this into consideration, the aim of this study was to compare the control and the induction of resistance to anthracnose in beans (*Phaseolus vulgaris*) caused by living cells of *Trichoderma harzianum* and

also by the metabolites produced in submerged fermentation. The bioproducts were applied via seed treatment and also via foliar application. Evaluations carried out in plants presented significant increase in specific peroxidase and in β -1,3-glucanase activities after pathogen inoculation, indicating the activation of induced resistance. The induction responses did not affect the accumulation of dry mass in plants. The use of *T. harzianum* in the form of living organisms or filtrate culture reduced the disease severity and has the potential to control the bean anthracnose and/or integrate disease management programs.

KEYWORDS: *Phaseolus vulgaris*, β -1,3-glucanase, Peroxidase, Biological control

1 | INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important agricultural crop characterized as a source of protein and fiber for human consumption, making it one of the most consumed legumes worldwide. The most important consumers regionally are South America (9.3 kg/per capita/year), the Caribbean (9.1 kg/per capita/year), Central America (8.8 kg/per capita/year) and Middle Africa (8.0 kg/per capita/year) (LUNA-VITAL et al., 2015).

Despite the importance of the beans for world agriculture, farmers fail to realize maximum potential yields because of several limiting factors, among them the incidence and severity of diseases. Anthracnose is one of the most common diseases in this crop, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scrib. (CHIORATO et al., 2006). It is a seed-borne disease and complete crop failure can be expected under heavy infection, due to the use of infected seeds and favourable climatic conditions for the pathogen growth (PINTO et al., 2010).

The control of the anthracnose is achieved mainly by treating soil and plants with fungicides that present many drawbacks. On the other hand, available fungicides usually have lower efficacy when weather conditions favor the pathogen growth and therefore the disease progress. (CHALFOUN et al., 2011). One alternative is the use of microorganisms with the capacity to elicit induction of systemic resistance against plant diseases. In this way, *Trichoderma* spp. has been acting in resistance induction in several pathosystems (TEIXEIRA et al., 2012; PEDRO et al., 2012).

The induction of resistance may be related to changes in protein synthesis. There is a set of proteins related to the interaction of *T. harzianum* with pathogenic fungi. Pereira et al., (2014) conducted a study of proteomics related to the presence or absence of *Rhizoctonia solani* or *Fusarium solani* on bean plants treated with *T. harzianum*, cataloguing proteins involved in the pathosystem. These authors demonstrated the existence of a differential expression pattern of genes related to plant defense system: chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase and lipoxygenase, with highest expression in the presence of *T. harzianum*.

The benefits obtained from the use of biological control are reiterated consecutively. However, responses are still variable and dependent on the plant x pathogen x organism interaction. In addition, there are numerous obstacles related to the use of bioproducts (MACHADO, 2012) as well as difficulties of mass production, contamination, formulations and stability, which could be circumvented with the use of more efficient bioprocesses. As the use of a living organism can induce systemic resistance, secondary metabolites produced by them in culture medium also may be used for the same purpose (VINALE et al., 2008; YOSHIOKA et al., 2012; VINALE, 2014).

However, there is few studies determining how the interaction of agricultural cultures with *R. solani* and *Trichoderma harzianum* and their secondary metabolites affect the plants growth and the level of expression of defense-related genes/proteins (SHARMA et al., 2017; PASCALE et al., 2017; MAYO et al., 2015). Based on this aspect, the aim of this study was to compare the control and the induction of resistance to anthracnose caused by living cells of *Trichoderma harzianum* and also by the metabolites produced in submerged fermentation.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganisms

Trichodermil SC 1306®, a commercial product containing *Trichoderma harzianum* with 2×10^9 viable conidia/mL as active ingredient was used as source of fungal agent. Avirulent isolate of *Colletotrichum lindemuthianum*, from the Mycology Collection of Plant Pathology Laboratory at Federal University of Santa Maria, GenBank accession number: BankIt1952792 COEJ KX845471, was used as pathogen.

2.2 Fermentations

Fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks of 250-mL containing 50 ml of autoclaved (121°C for 20 min) liquid culture medium composed of sucrose 5 g.L⁻¹, corn steep liquor 15.0% (m/v) and yeast extract 10 g.L⁻¹ at pH 6.5. After cooling, each flask was inoculated using 1 mL of spore suspension of *T. harzianum*. Incubation was performed in a shaker (Innova 44R, New Brunswick) under constant stirring at 120 rpm, 28 °C and with a photoperiod of 12 h for 96 h. After the end of fermentation, fermented broth was vacuum-filtered in membrane Millipore® of 12 µm with to remove the fungal cells, and then immediately frozen for later analysis.

2.3 Biological activity of bioproducts under greenhouse conditions

In all tests were used *Phaseolus vulgaris* seeds from *Minuano* cultivar with

susceptibility to *Colletotrichum lindemuthianum*. Before the sown, the seeds were disinfested in 70% alcohol bath for 30 s, following by 1% sodium hypochlorite bath for 30 sand for three baths of 30 s each in distilled and sterile water. The seeds remained at room temperature for 2 h for drying on filter paper.

2.3.1 Induction of resistance

Four treatments were accomplished aiming to evaluate the induction to anthracnose resistance in beans. Treatments T1 and T2 consisted in the application of commercial product (Trichodermil® SC) in seeds and leaf, respectively, whereas T3 and T4 filtered culture broth without cells was applied in seeds and leaf, respectively.

For the seeds treatments (T1 and T3), a dose of 1 ml of commercial product or filtered culture broth for each 200 seeds was used. Plants were grown in pots of 3 L, with commercial substrate supplemented with complete nutrient solution and kept in a heated greenhouse during the whole experiment. A suspension of *C. lindemuthianum* spores at a concentration of 3.5×10^5 spores per mL was sprayed with a manual sprayer in plants when they began issuance of flower buds.

For foliar treatments (T2 and T4), 200 seeds without treatment were grown in pots of 3 L, with commercial substrate supplemented with complete nutrient solution and kept in a heated greenhouse during the whole experiment. When the reproductive stage started at the products were sprayed using a manual sprayer. The dose for commercial product was 10 mL per liter, whereas for culture filtrate was 400 ml per liter. A suspension of *C. lindemuthianum* spores at a concentration of 3.5×10^5 spores per mL was sprayed with a manual sprayer in plants when they began issuance of flower buds.

Two control tests were accomplished (C1 and C2). In C1, the seeds without treatment were cultivated and the pathogen inoculated as described above. In the C2, the seeds without treatment and free of pathogen were cultivated as described above.

Five days after inoculation (DAI) of pathogen, when the plants began to present the foliar disease symptoms, daily evaluations were carried out based on a diagrammatic scale adapted from Dalla Pria, Amorim and Bergamin Filho (2003), with rates from 1 (no disease symptoms) to 9 (very severe infection). Based on these evaluations, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated (CAMPBELL; MADDEN, 1990), according to the following equation:

$$AUDPC = \sum \left[\left(\frac{Y_1 + Y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right]$$

Y_1 : evaluation grade at time t_1 ;

Y_2 : Consecutive evaluation grade at time t_2 ;

$t_2 - t_1$ the time elapsed between two consecutive evaluations.

Disease severity was evaluated on the tenth day after inoculation of pathogen (DAI). The same diagrammatic scale was used as well as a converted score in the index of disease (ID) of McKinney (MCKINNEY, 1923):

$$ID (\%) = \frac{\sum(Y * X_y)}{(X_t * h)} * 100$$

Y: note;

X_y : number of plants with this note;

X_t : total number of plants;

h: maximum value of the scale.

2.3.2 Enzymes related to induction of resistance

For biochemical analysis, entire plants were removed, separating the third pair of leaves. Leaf veins were removed for analysis. Roots were also collected for the determination of IAA-oxidase, prioritizing the primary root and older roots, removing by absorbent and secondary roots. All collected tissue was weighed and immediately frozen. The samples were stored in this condition until the completion of the analyses.

Peroxidase activity

For the determination of peroxidase activity, 0.2 g of frozen tissue was macerated with approximately 1 mg of polyvinylpyrrolidone plus 20 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was filtered, centrifuged at 6,000 rpm for 30 min and the precipitate was discarded. The entire procedure was carried out at maximum temperature of 4°C. Peroxidase activity was determined using the methodology described by Campos et al. (2004). In tubes previously immersed in ice bath, 2.5 mL of phosphate-citrate buffer pH 5.0 (0.2 M dibasic sodium phosphate and 0.1 M citric acid), 1.5 mL of enzyme extract, 0.25 mL of 0.5% guaiacol and 0.25 mL of 3% H₂O₂ were mixed. Subsequently, they were mixed in vortex for 15 seconds. This mixture was incubated in water bath at 30°C for 15 min. After that, 0.25 mL of 2% sodium metabisulfite was added. The samples were mixed in vortex again and let to sit for 10 min. As a control for the enzyme reaction, the enzyme extract was replaced by water. The absorbance was read at 450 nm, in UV PC spectrophotometer Shimadzu. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme extract that provided absorbance increase of 0.001 unit per minute (CAMPOS et al., 2004), expressed per gram of fresh tissue or per mg of protein (specific activity).

β-1,3-glucanase activity

Determination of β-1,3-glucanase activity was performed by the method of Abeles;

Forrence (1970), modified by Campos et al. (2009). Frozen leaves were macerated at a temperature of 2°C in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.4), containing 0.1% (v/v) β -mercaptoethanol and 0.1% (w/v) L-Ascorbic acid. The homogenate was centrifuged at 15,000 g for 30 min at a temperature from 0 to 4° C. The precipitate was discarded and 0.5 mL of supernatant was treated with 1 of mL chilled acetone at -20° C for 90 min. The suspension was centrifuged at 15,000 g for 30 min between -4 and 0° c. The sedimented precipitates were vacuum-dried for 48 h at room temperature, and resuspended in 62.5 μ L of 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.2). 0.1 mL of laminarin at 4% was added to this suspension, which was incubated at 40° C for 10 min. The reaction was stopped by the addition of μ L 375 of 3,5-dinitrosalicylic acid to the mixture, followed by heating in boiling water bath for 5 min. Resulting solution was diluted with 4.5 mL of water and agitated in vortex. The absorbance readings were made at 500 nm in UV PC spectrophotometer Shimadzu. β -1,3-glucanase activity was expressed in nmol per mg of fresh tissue to observe the reaction speed, and specific activity was expressed in nmol per mg of protein.

IAA-oxidase activity

The preparation of enzyme extract to determine the IAA-oxidase activity, the methodology used was the one proposed by Saleh (1981) with modifications. To obtain the extract, 1 g of frozen root was macerated with the use of liquid nitrogen plus 2.5 mL of distilled water. The extract obtained was centrifuged at 30,000 g for 30 min. The entire process was carried out at a maximum temperature of 4°C. Supernatant was used to determine the enzyme and the discarded precipitate. To determine IAA-oxidase activity, 0.5 mL of the extract prepared was supplemented with 0.5 mL of a solution containing 1 mM of IAA, 0.25 mL of 2,4 dichlorophenol (1 mM), 0.25 mL MnCl₂ (1 Mm), and 1 mL of distilled water at 25°C. The enzyme-substrate was incubated for 60 min at a temperature of 25°C. The reaction was interrupted with the addition of 2 mL of the mixture containing 1 ml of 0.5 m FeCl₃ in 50 mL of 35% HClO₄ and the reading was made in spectrophotometer (Shimadzu, model UV 1601) at 530 nm using standard curve (GORDON; WEBER, 1951). The enzyme activity was expressed as μ mol of IAA degraded by g of fresh tissue during 60 min.

Total protein

Determination of protein was performed by the method of Bradford (BRADFORD, 1976) in the vegetable extract, which was prepared for peroxidase activity reading, using albumin as standard.

2.4. Statistical analysis

For each variable analyzed, the average was calculated and the data normality was verified through Kolmogorov-Smirnov test. Subsequently, the analysis of variance was performed through F-test at 95% probability level and the differences between the averages were compared through Scott-Knott test at 95% probability level, using the software SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the results referring to induction of resistance to anthracnose in bean by the bioproducts of *Trichoderma harzianum*. Independent of bioproduct (living organism or culture filtrate) or form of application (leaf or seeds) induced the resistance to anthracnose. The disease severity and the disease progress didn't present significant difference ($p < 0.05$) compared with control free of pathogen (C2). By other hand, control inoculated with pathogen (C1) increased the disease severity and progress, being statistically different from C2 and treatments T1-T4. The effects of the treatments were observed in the activity of peroxidase, β -1,3-glucanase, IAA-oxidase as well as in the protein levels before and after inoculation.

Application of bioproducts induces defense responses in bean plants by the increase of the peroxidase activity after the application of pathogen. Peroxidase is an important enzyme of plants and it is involved in many reactions, polysaccharides, oxidation of indole-3-acetic acid, monomers, lignification, wound healing, phenol oxidation, pathogen defense, regulation of cell elongation and others (ALMAGRO et al., 2009).

β -1,3-glucanase acts directly on the glucans in the cell wall of phytopathogenic fungi, inhibiting their development. The activity of β -1,3-glucanase was similar in all treatments and comparable to C2 (healthy plant). However, the levels of β -1,3-glucanase in the plants without any treatment (C1) reduced about 50%. Assessing capacity of response of the plants, determining β -1,3-glucanase activity, it is observed that even before the presence of the pathogen, the foliar application of bioproducts of *Trichoderma harzianum* increased the levels of this enzyme, and this remains even after inoculation of the pathogen, when plants have the highest levels. The application of the live microorganism via seed didn't yield a satisfactory response, while the culture filtrate applied via seed showed response after inoculation of the pathogen, evidencing the systemic and localized action in the induction of resistance.

Correlation analysis between AUDPC and specific activity of β -1,3-glucanase prior to pathogen inoculation was negative and statistically significant ($R = 0.75$), as well as the correlation between the disease index and specific activity of β -1,3-glucanase ($R = 0.87$). These results can be attributed to the progress reduction and disease severity by the stimulation of resistance induction by the fungus, thus inducing the activity of this

isoenzyme, hampering penetration and establishment of the pathogen.

The enzyme IAA-oxidase is responsible for IAA hormone oxidation, decreasing the levels of growth hormone in the root. The activity of this enzyme increased after pathogen inoculation, but only control C1 was statistically different from other treatments. This demonstrates that the treatments were effective to prevent the disease progress caused by *C. lindemuthianum*.

Protein levels increased, but no statistical difference was verified before and after pathogen inoculation. After a pathogen attack, the plant produces numerous defense responses, which include protein synthesis and relocation, often leading to energy expenditure which is able to retard plants growth and development (HEIL; BALDWIN, 2002). In a general way, a decrease in the fresh and dry mass of plants occur, due to great energetic requirements for the synthesis of proteins and enzymes. However, in this study, fresh and dry mass of plants at the beginning of infection was not affected (data not shown), even with the increase of protein levels and enzyme activities. One of the reasons may be the fact that species of *Trichoderma* act as growth promoter increasing the fresh and dry mass of plants (CHACÓN et al., 2007) and seedlings (JUNGES, et al., 2015).

The use of culture filtrate of *T. harzianum* is considered a tool in the integrated management of diseases. This organism produces a great quantity and variety of compounds. These bioproducts may still be used in association with chemical fungicides and as resistance management tool (GONZALEZ et al., 2002), or they may replace them, considering the environmental and economic advantages that they provide (LIU et al., 2008).

In this study, a joint investigation of sequential applications in seeds and leaf was not carried out. However, based on the breadth of responses observed, it is expected that the effects may be cumulative and synergistic, indicating the benefits of management programs for anthracnose in bean based on organic products produced from isolates of *Trichoderma harzianum*.

4 | CONCLUSIONS

The resistance induction responses observed in this study showed that both living cells of *Trichoderma harzianum* and culture filtrate containing secondary metabolites were efficient in the induction of resistance to anthracnose in bean plants. The severity and disease progress were controlled with the bioproducts of *Trichoderma harzianum*. The levels of enzymes associated with the anthracnose induction as peroxidase and β -1,3-glucanase increased after the inoculation of pathogen. The induction of resistance to anthracnose in beans by living cells of *Trichoderma harzianum* is not a new, since this is well documented in literature. However, the main contribution of this study was demonstrate the positive effect of culture filtrate for this purpose. These results open

new possibilities in the development of natural products for modern agriculture.

ACKNOWLEDGEMENTS

Support team of the plant physiology of the Embrapa Temperate Climate, Pelotas, RS, Brazil, and CNPq for scholarship to second author.

FUNDING SOURCES

This work was supported by the Federal Institute of Education, Science and Technology Farroupilha, Rio Grande do Sul, Brazil.

REFERENCES

ALMAGRO, L., GÓMEZ ROS, L.V., BELCHI-NAVARRO, S., BRU, R., ROS BARCELÓ, A., PEDREÑO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n.2, p. 377–390, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAMPBELL, C.L., MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley e Sons, 532p. 1990.

CAMPOS, A. D., FERREIRA, A.G., HAMPE, M.M.V., ANTUNES, I.F., BRANCÃO, N., SILVEIRA, E.P., OSÓRIO, V.A., AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CAMPOS, A.D., HAMPE, M.M.V., FERREIRA, A.G., ANTUNES, I. F., CASTRO, L.A.S. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.15-21, 2009.

CHACÓN, M.R., RODRÍGUEZ-GALÁN, O., BENÍTEZ, T., SOUSA, S., REY, M., LLOBELL, A., DELGADO-JARANA, J. Microscopic and transcript me analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **Internacional Microbiologi**. v.10, p.19-27, 2007.

CHALFOUN, N.R., CASTAGNARO, A.P., DÍAZ RICCI, J.C. Induced resistance activated by a culture filtrate derived from an avirulent pathogenas a mechanism of biological control of anthracnose in strawberry. **Biological Control**, v. 58, p. 319–329, 2011.

CHIORATO, A.F., CARBONELL, S.A.M., MOURA, R.R., ITO, M.F., COLOMBO, C.A. Co-evolução entre raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. **Bragantia**, v.65, p.381-388, 2006.

DALLA PRIA, M., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GONZALEZ, C.F., PROVIN, E.M., ZHU, L., EBBOLE, D.J. Independent and synergistic activity of

- synthetic peptides against thiabendazole resistant *Fusarium sambucinum*. **Phytopathology**, v. 92, p. 917-924, 2002.
- GORDON, S.A., WEBER, R.P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**. v. 1, p. 192–195, 1951.
- HEIL, M., BALDWIN, I.T. Fitness cost of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 61-67, 2002.
- JUNGES, E., MUNIZ, M.F.B., BASTOS, B.O., ORUOSKI, P. Biopriming in bean seeds, **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section B — Soil & Plant Science, DOI: 10.1080/09064710.2015.1087585. 2015.
- LIU, S., RUAN, W., LI, J., XU, H., WANG, J., GAO, Y., WANG, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**, v. 166, p. 93-102, 2008.
- LUNA-VITAL, D.A., MOJICA, L., MEJÍA, E.G., MENDOZA, S., LOARCA-PIÑA, G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **Food Research International**, v. 76, p. 39–50, 2015.
- MACHADO, D.F.M., PARZIANELLO, F.R., SILVA, A.C.F., ANTONIOLLI, Z.I. *Trichoderma* No Brasil: O Fungo e o Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, 2012.
- MAYO, S. GUTIÉRREZ, S., MALMIERCA, M.G., LORENZANA, A., CAMPELO, M.P. HERMOSA, R., CASQUER, P.A. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-11, 2015.
- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v.26, p. 195-218, 1923.
- PASCALE, A., VINALE, F., MANGANIELLO, G., NIGRO, M., LANZUISE, S., RUOCCO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., WOO, S.L., LORITO, M. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. **Crop Protection**, v. 92, p. 176–181, 2017.
- PEDRO, E.A.S., HAKAKAVA, R., LUCON, C.M.M., GUZZO, S.D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p.1589-1595, 2012.
- PEREIRA, J.L., QUEIROZ, R.M.L., CHARNEAU, S.O., FELIX, C.R., RICART, C.A.O., SILVA, F.L. STEINDORFF, A.S., ULHOA, C.J., NORONHA, E.F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* Response to Its Association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the Presence or Absence of the Phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **PLoS ONE**. v. 9, n.5, 2014.
- PINTO, J.M.A., SOUZA, E.A., OLIVEIRA, D.F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, v. 29, p. 838–842, 2010.
- SALEH, A.N. The effect of kinetin on the indolacetic acid level and indolacetic acid oxidase activity in roots of young plants. **Physiologia Plantarum**. v.51, p.399-401, 1981.
- SHARMA, V., SALWANA, R., SHARMA, P.N., KANWAR, S.S. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 72–79, 2017.
- TEIXEIRA, H., PAULA JÚNIOR, T.J., VIEIRA, R.F., SILVA, M.B., FERRO, C.G. LEHNER, M.S. *Trichoderma* spp. Decrease *Fusarium* root rot in common bean. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 334-336, 2012.

VINALE, F. A Novel Fungal Metabolite with Beneficial Properties for Agricultural Applications. **Molecules**, v. 19, p. 9760-9772. 2014.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., BARBETTI, M.J., LI, H., WOO, S.L., LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n.6, p. 80–86, 2008.

YOSHIOKA, Y., ICHIKAWA, H., NAZNIN, H.A., KOGURE, A., HYAKUMACHI, M. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seed borne diseases of rice. **Pest Management Science**, v.68, p.60–66. 2012.

Treatment	AUDPC	Disease Index (%)	Protein		IAA oxidase		Peroxidase		β-1,3-glucanase	
			BI (mg.g ⁻¹)	AI (mg.g ⁻¹)	BI (U.g ⁻¹)	AI (U.g ⁻¹)	BI (U.g ⁻¹)	AI (U.g ⁻¹)	BI (U.g ⁻¹)	AI (U.g ⁻¹)
T1	4.1 ^B	15.2 ^B	14.24 ^{Aa}	11.99 ^{Ba}	0.46 ^{Ab}	1.05 ^{Ba}	58.44 ^{Ab}	113.01 ^{Ba}	6.21 ^{Aa}	8.83 ^{Aa}
T2	4.5 ^B	16.7 ^B	14.96 ^{Aa}	11.72 ^{Ba}	0.46 ^{Ab}	1.00 ^{Ba}	59.54 ^{Aa}	94.07 ^{Ba}	6.27 ^{Ab}	9.91 ^{Aa}
T3	4.0 ^B	14.0 ^B	15.64 ^{Aa}	18.6 ^{Aa}	0.48 ^{Aa}	0.69 ^{Ba}	81.35 ^{Ab}	153.3 ^{Aa}	8.61 ^{Aa}	9.87 ^{Aa}
T4	3.5 ^B	11.0 ^B	13.31 ^{Aa}	16.85 ^{Aa}	0.96 ^{Ab}	1.27 ^{Ba}	80.95 ^{Ab}	130.79 ^{Aa}	8.63 ^{Aa}	8.56 ^{Aa}
C1	7.9 ^A	30.2 ^A	13.23 ^{Ab}	19.13 ^{Aa}	0.78 ^{Ab}	1.83 ^{Aa}	75.67 ^{Aa}	72.4 ^{Ba}	7.99 ^{Aa}	4.39 ^{Bb}
C2	3.5 ^B	11.0 ^B	14.22 ^{Aa}	14.15 ^{Ba}	0.4 ^{Aa}	1.00 ^{Ba}	67.75 ^{Aa}	92.84 ^{Ba}	7.03 ^{Aa}	7.48 ^{Aa}

Table 1 - Evaluation of area below the disease progress curve (AUDPC), McKinney Disease Index (%) and profile of protein and excreted enzymes in bean treated with *Trichoderma harzianum* or secondary metabolites by seed or by foliar application.

BI and AI – Before and after inoculation of the pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*, respectively;

Means followed by the same upper case letter in the column do not differ by the Scott Knott test at 5% probability;

Means followed by the same lower case letter in the room do not differ before and after inoculation of pathogen by the Scott Knott test at 5% probability;

ANALYSIS OF PRE-TREATMENT OF PINEAPPLE WASTE WITH HYDROGEN PEROXIDE IN THE OBTENTION OF TOTAL REDUCING SUGARS

Fernanda Ferreira Freitas

Federal University of Goiás, Institute of Chemistry,
Graduate Program in Chemical engineering,
Goiânia, Goiás.

Lorena Costa Vasconcelos Macedo

Federal University of Goiás, Institute of Chemistry,
Graduate Program in Chemical engineering,
Goiânia, Goiás

Carlos Alberto Galeano Suarez

Federal University of Goiás, Institute of Chemistry,
Graduate Program in Chemical engineering,
Goiânia, Goiás.

Araceli Aparecida Seolato

Federal University of Goiás, Institute of Chemistry,
Graduate Program in Chemical engineering,
Goiânia, Goiás.

Inti Doraci Cavalcanti-Montaño

Federal University of Goiás, Institute of Chemistry,
Graduate Program in Chemical engineering,
Goiânia, Goiás.

Paula Rubia Ferreira Rosa

Federal University of São Carlos, Institute of
Chemistry Engineering, São Carlos, São Paulo.

ABSTRACT: In order to take advantage of the waste generated by the pulp and fruit juice industries, the objective of this work was to study the use of pineapple biomass to obtain reducing sugars for future production of second-generation (2G) bioethanol. They were evaluated as better conditions of treatment of the dry and

crushed biomass, using the hydrogen peroxide. The study was performed through a full factorial experiment, analyzing the factors: peroxide concentration, time and temperature. Then, the hydrolysis was carried out with 2.9% v / v sulfuric acid in all samples and, finally, the determination of the total reducing sugars (TRS). Analyzing the results, it was observed that the factors time and temperature did not present significantly different answers in the interval studied. On the other hand, the variation in the concentration of hydrogen peroxide presented different results significantly, in that when smaller concentrations were used, higher values of TRS were obtained. **KEYWORDS:** pineapple waste, hydrogen peroxide, total reducing sugars

RESUMO: A fim de aproveitar os resíduos gerados pelas indústrias de polpa e suco de frutas, o objetivo deste trabalho foi estudar a utilização de biomassa de abacaxi para a obtenção de açúcares redutores para uma futura produção de bioetanol de segunda geração (2G). Eles foram avaliados como melhores condições de tratamento da biomassa seca e triturada, utilizando o peróxido de hidrogênio. O estudo foi realizado através de um experimento fatorial completo, analisando os fatores: concentração de peróxido, tempo e temperatura. Em seguida, a hidrólise foi realizada com ácido sulfúrico a 2,9% v / v em

todas as amostras e, finalmente, a determinação dos açúcares redutores totais (TRS). Analisando os resultados, observou-se que os fatores tempo e temperatura não apresentaram respostas significativamente diferentes no intervalo estudado. Por outro lado, a variação na concentração de peróxido de hidrogênio apresentou resultados significativamente diferentes, na medida em que, quando menores concentrações foram utilizadas, maiores valores de ERT foram obtidos.

1 | INTRODUCTION

Second-generation (2G) bioethanol presents great potential for growth, not only because it does not depend on the production of food for its industrialization, but also on the expansion of the planted area, but on the reuse of waste from production, so the main advantage of bagasse is Logistics, since it is a co-product that is already available (Araújo *et al.*, 2013). They can be transformed not only into raw materials for secondary processes, but also can be commercially made products. These residues have in their composition cellulose and hemicellulose, these structures after suffering saccharification can be converted to fermentable sugars, such as glucose and xylose (Boussarsar *et al.*, 2009). Thus, the use of pineapple bagasse as a possible biomass for the production of second generation ethanol was evaluated by correlating the time (h), temperature (°C) and alkaline hydrogen peroxide (%) concentration of pre-treatment submitted to diluted acidic hydrolysis, aiming at the greater obtaining of TRS.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of biomass

The pineapple bagasse was supplied by the Doce Vida industry, located in Anápolis, Goiás. Before being stored, it was oven dried at 60 ° C for three days, then crushed and sieved, then stored in hermetically sealed containers.

2.2 Pretreatment with alkaline hydrogen peroxide

Samples of 4g of the dry biomass were treated with 100 mL of hydrogen peroxide solution (H₂O₂), and its pH adjusted to 11.5 by the addition of sodium hydroxide (20 mol / L), according to the methodology described by Krishna (2000). The temperature, the reaction time and the concentration of the hydrogen peroxide used were established by the experimental design. They were then charged to a shaker orbital shaker under agitation of 150 rpm. After the reaction time, it was filtered and washed the solution several times with distilled water in order to obtain a neutral pH in the residue.

2.3 Acid hydrolysis

After pretreatment the filtrate was collected and dried at 40 °C to constant weight, after acid hydrolysis was performed for each experiment, the solids were transferred to 125 mL Erlenmeyer flask and treated with 25 mL of sulfuric acid (H₂SO₄) 2.9% m / v. Subsequently, the flasks of Erlenmeyer flasks were closed with aluminum foil and autoclaved for 30 min at 121 ° C has been shown (Moutta *et al.*, 2011). After decompression of the autoclave, the flasks were removed and cooled to room temperature, the solid fraction being separated from the liquid fraction by vacuum filtration. The hydrolysates of all the samples were neutralized with sodium hydroxide and the total reducing sugars were quantified.

2.4 Quantification of total reducing sugars (TRS)

For the quantification of ART, the dinitro-3,5-salicylic acid (DNS) method described by (Miller, 1959) was used. For this, it was necessary to construct a standard curve of glucose with concentrations ranging from 0 to 10 mg / mL. Where necessary, dilutions of the samples were performed so that the resulting absorbance was within the range of the standard curve.

2.5 Experimental planning

A 2³ factorial design with three central points and six axial points was used, totaling 17 experiments and 34 responses. From this factorial planning, we studied the variables that affect the efficiency of the pretreatment with alkaline hydrogen peroxide. The unit of measurement of the response was chosen in g of crude bagasse / g (without any treatment) so that the bulk yield of the process could be compared to the mass of the bagasse before any treatment

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The table 1 presents the planning matrix, with the values, and the quantity responses of ART, produced after the acid hydrolysis, of each experiment.

Experiment	Time (h)	Temperature (°C)	H2O2 Concentration (% v/v)	TRS) (g / g bagasse)
1	8	20	2	0.0929
2	8	20	6	0.0510
3	8	50	2	0.0779
4	8	50	6	0.0452
5	24	20	2	0.105
6	24	20	6	0.0480

7	24	50	2	0.0709
8	24	50	6	0.0393
9	2.54	35	4	0.0510
10	29.45	35	4	0.0545
11	16	9.77	4	0.0733
12	16	60.23	4	0.0702
13	16	35	0.64	0.0833
14	16	35	7.36	0.0449
15	16	35	4	0.0717
16	16	35	4	0.0674
17	16	35	4	0.0680

Table 1. Factorial design matrix and total reducing sugars responses for pre-treatment with alkaline hydrogen peroxide in pineapple bagasse.

Analyzing Table 2, in tests 1, 3, 5, 7 and 13, it is observed that the higher production of reducing sugars occurred at low peroxide concentrations, setting a good result due to the reagent economy. It was verified that the time variable has no significant effect on the response, observed by the tests 9 and 10, that is, the best responses occur throughout the studied time frame. Therefore, the ideal time for this pretreatment may be of lower values. In the case of the temperature variable, it is noticed that the higher production of TRS occurs at the lower temperatures studied, so it is verified that it is possible to conduct pretreatment at ambient temperatures, generating savings in the process. On the other hand, the variable peroxide concentration has better responses in the lower ranges studied. One possible explanation could be that excess peroxide degrades the cellulose present in the biomass. It is noted that the best results were in experiments 1 and 5, where TRS masses of 0.0929 g / g crude bagasse and 0.105 g / g crude bagasse, respectively, were obtained.

4 | CONCLUSION

As based on the results, it is possible to observe that the best operating condition to obtain total reducing sugars from the pineapple bagasse was 20^oC, which represents in energy terms an advantage due to the use of low temperatures reducing the process costs. On the other hand, the pretreatment time of alkaline hydrogen peroxide was not significant in the studied range. However, new studies should be carried out in order to include a point of higher TRS.

REFERENCES

Araújo, DE G.J.F., Navarro, L. F.S, Santos, B. A. S., 2013. O Etanol de Segunda Geração e sua Importância Estratégica ante o Cenário Energético Internacional Contemporâneo. ANAP. IX Fórum Ambiental da Alta Paulista.

Boussarsar, H.; Rogé B.; Mathlouthi, M., 2009. Optimization of sugarcane bagasse conversion by

hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology*. 5, 6537-6542.

Krishna, H. S., 2000. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1971-1976.

Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Moutta, R.O.; Chandel, A.K.; Rodrigues, R.C.L.B.; Silva, M.B.; Rocha, J.M.; Silva, S.S. 2011. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. *Sugar tech.*, 14, 53-60.

USE OF LINEAR EQUATIONS FOR DETERMINATION OF APPARENT KINETIC PARAMETERS IN CELLULOLYTIC MEDIUM WITH *Trichoderma virens*

Nelson Rosa Ferreira

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém-Pará

Suelem Paixão da Silva

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém-Pará

Rubens Menezes Gobira

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém-Pará

Maria Inez de Moura Sarquis

Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro-RJ

Alberdan Silva Santos

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém-Pará

ABSTRACT: The selection of microorganisms with the potential of deconstruction of cellulose to obtain fermentable sugars has been the subject of research to obtain lineages with technological potential. The Submerged mycelial culture is a technique that allows a quick response on the lineage of interest. The determination of the apparent kinetic parameters K_M and V_{max} is essential to evaluate initially the enzyme's affinity for the substrate and the maximum rate of product formation. In this sense, the cultivation of the microorganism was performed in conical flasks with orbital agitation where

mycelium of *Trichoderma virens* isolated from marine xylophagous was inoculated. For the determination of K_M and V_{max} the liquid culture was used as the enzymatic agent. The values of K_M and V_{max} were estimated by the methods of Lineweaver-Burk, Hanes, Eadie-Hofstee and Carvalho. It was observed that the models of Hanes and Carvalho were the ones who presented values of K_M closer to each other, and the values of K_M and V_{max} for Lineweaver-Burk became more away from others models. It was noted, however, that the coefficient of determination for Lineweaver-Burk showed a higher quality adjustment.

KEYWORDS: Submerged culture, *Michaelis constant*, *Trichoderma*.

RESUMO: A seleção de micro-organismos com potencial de desconstrução de celulose para obtenção de açúcares fermentáveis tem sido o foco de pesquisas com intuito de obter linhagens com potencial tecnológico. O cultivo micelial submerso é uma técnica que permite uma resposta rápida sobre a linhagem de interesse. A determinação dos parâmetros cinéticos aparentes K_M e V_{max} é essencial para avaliar inicialmente a afinidade da enzima pelo substrato e a taxa máxima de formação do produto. Neste sentido, o cultivo do micro-organismo foi realizado em frascos cônicos com agitação orbital, onde foi inoculado o

micélio de *Trichoderma virens* isolado de xilófagos marinhos. Para a determinação de K_M e V_{max} , utilizou-se a cultivo líquido como agente enzimático. Os valores de K_M e V_{max} foram estimados pelos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes, Eadie-Hofstee e Carvalho. Observou-se que os modelos de Hanes e Carvalho foram os que apresentaram valores de K_M mais próximos entre si, e os valores de K_M e V_{max} para o Lineweaver-Burk ficaram mais distantes dos outros modelos. No entanto, foi observado que o coeficiente de determinação de Lineweaver-Burk apresentou um melhor ajuste.

PALAVRAS-CHAVES: Cultivo submerso, constante de Michaelis, *Trichoderma*.

1 | INTRODUCTION

Trichoderma spp. are filamentous fungi present in different habitats and commonly found in the soil and decaying wood. It is the genus of filamentous fungi more susceptible to cultivation in synthetic medium, demonstrating a high opportunistic potential and adaptabilidade to diverse environmental conditions. They are efficient producers of many extracellular enzymes that can act to form synergistic in cellulolytic substrates through the action of two Exoglucanases (CBHI and CBHII), five Endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV, and EGV), and two glycosidases (BGI and BGII) (SINGH et al., 2009).

Several current computer systems allow a nonlinear adjustment for the determination of kinetic parameters, however, a linear fit is simpler to be presented and enables an understanding of the experimental points which have larger deviation of a Michaelis-Menten type behavior (CARVALHO et al., 2010). In this work, four different linear equations were used in order to compare the final results of the apparent kinetic parameters K_m and V_{max} and to determine which linear regression method produces the best parameters that represent the culture in liquid medium under the established conditions.

2 | METHODOLOGY

2.1 Preparation of the inoculum

The lineage of *Trichoderma virens* was isolated from a *marine xylophagous* (FERREIRA, 2012). The primary cultivation of this lineage was grown in GPY medium (glucose 20 g L⁻¹, peptone 5 g L⁻¹, yeast extract 5 g L⁻¹ and agar 20 g L⁻¹; pH 6.8) from mycelia fragments preserved in glycerol (5%). Subsequently, the microorganism was grown on CMC agar (peptone 2.5 g L⁻¹; yeast extract 2.5 g L⁻¹; sodium carboxymethyl cellulose 10 g L⁻¹ and agar 15 g L⁻¹; pH 5.0) for 72 hours. Fragments of mycelium (100 units) measuring 3.0 mm were used as inoculum for submerged culture.

2.2 Submerged culture

The submerged culture was performed in conical flasks with orbital agitation in 500 mL of liquid medium: yeast extract 1.0 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1.1 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0.1 g L⁻¹; NaNO₃ 0.1 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O 0.3 g L⁻¹; microcrystalline cellulose 5.0 g L⁻¹ and tween 80 1.0 g L⁻¹; initial pH 4.8, 150 RPM at 29° C for 8 days. The pH was controlled at 5.0 by the addition of HCl 50% (v/v). After the end of submerged culture, the biomass was separated from the liquid phase by filtration through glass wool. This liquid phase was called “enzymatic preparation” and was used as enzyme agent in the assays.

2.3 Reducing sugars measurement

The Reducing sugars measurement was carried out from the modified methodology proposed by Miller (FERREIRA, 2012).

2.4 CMCase activity determination

CMCase activity was determined using 500 µL of the enzymatic preparation and 1000 µL of carboxymethylcellulose (CMC) in sodium citrate buffer (0.15 M, pH 4.8). The system was incubated at 60°C for 30 minutes in a dry bath at 400 RPM. CMCase activity was defined as relative CMCase = UCM/mL*, UCM was defined as the amount of enzyme capable of releasing a micromol (µmol) of reducing sugars per minute and mL* represents the volume of enzymatic preparation. The assays were performed in triplicate.

2.5 Determination of apparent kinetics parameters

The reactional conditions were established at 60°C using the enzymatic preparation and CMC as a cellulosic substrate at concentrations between 0.3 and 3.3 g L⁻¹ in citrate buffer (0.15 M, pH 4.8). The kinetic parameters were determined by linear regression using a statistical computer program with the results expressed as KM, Vmax and R2 at a confidence level of 95%. The Lineweaver-Burk, Hanes, Eadie-Hofstee and Carvalho et al models were used as shown in equations 1 to 4 respectively (CARVALHO et al., 2010).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{S}{V_{max}} \quad (2)$$

$$V = V_{max} - K_M \cdot \left(\frac{V}{S}\right) \quad (3)$$

$$S = V_{max} \cdot \left(\frac{S}{V}\right) - K_M \quad (4)$$

3 | RESULTS AN DISCUSSION

The graph of (V vs S) and their respective values are the starting point for obtaining all the evaluated models (figure 1). The error bars represent the standard deviations ($n = 3$) of velocity measurements. This result shows that the reaction rates measured in this work can be applied to the Michaelis-Menten kinetic model, which is characterized by the hyperbolic profile.

It can be seen in table 1 that the Hanes and Carvalho et al models presented the KM values very close. The largest relative difference of KM was in the order of 23% between Carvalho et al and Lineweaver-Burk. Among the calculated determination coefficients (R^2), it was observed that Lineweaver-Burk presented the highest value (0.997) and Eadie-Hofstee the lowest value (0.931). The equations obtained from each linear regression method and your graphical representation are presented in Figure 2 (A-D).

The use of the Hofstee Eadie and Carvalho et al equations are simpler since the linear and angular coefficients of the lines directly give the values of V_{max} and $-K_M$ (Eq. 3 and 4). Despite the high correlation between the variables plotted by Lineweaver-Burk, this model tends to agglomerate the points at higher substrate concentrations, unlike what happens for the other methods (Figure 2A). Analyzing only the EadieHofstee model it was possible to observe that the dependent variable V (hydrolysis speed observed for each substrate concentration) appears in both the coordinates, leading to the errors propagation. This may explain to some extent the smallest value of R^2 observed experimentally for this model.

According to Carvalho et al. (2010), the Hanes equation (Eq. 2) was investigated by Lineweaver and Burk who concluded that the Hanes equation produced better results for low substrate concentrations. Otherwise, according to Castro et al., 2010, the Hanes model is presented as the most accurate for the estimation of kinetic parameters but the independent variable appears on both sides of the equation and the x-axis is IS not $1/[S]$ as in the Lineweaver-Burk plot. V_{max} and K_M are not read directly off the plot.

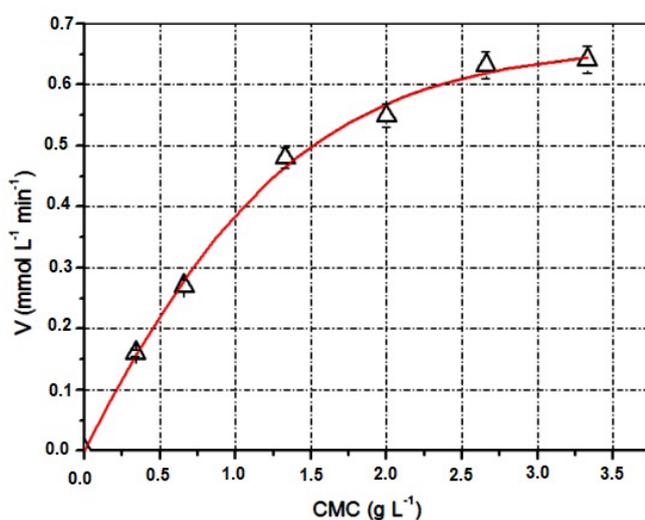


Figure 1. Graph V vs S (concentration of CMC as cellulosic substrate) and enzymatic preparation.

The table 1 shows the confidence intervals (CI) for each kinetic parameter evaluated. It was observed that Lineweaver-Burk presented the best determination coefficient, but also presented the highest relative errors of KM and Vmax ($\pm 20\%$ and $\pm 17\%$ respectively) when the CI was evaluated. The lowest relative errors of KM and Vmax were observed for the Hanes ($\pm 9\%$ and $\pm 5,5\%$ respectively) and Carvalho ($\pm 8\%$ and 6% respectively) models. The Carvalho equation has a manipulation advantage over the Hanes equation because the values of Vmax and -KM appear directly as the angular and linear coefficients of the line (Eq. 4). The Hofstee plot estimates of KM and Vmax have smaller standard errors than those based on Lineweaver-Burk plot but the estimates of KM and Vmax are not as close to those obtained using the Hanes and Carvalho models.

	KM - CI	V _{max} (mmol L ⁻¹ min ⁻¹) - CI	R ²
Lineweaver-Burk \pm SE	2.01 \pm 0.40 (1.61 at 2.41)	1.107 \pm 0.188 (0.919 at 1.295)	0.9970
Hanes \pm SE	1.66 \pm 0.15 (1.51 at 1.81)	0.997 \pm 0.055 (0.942 at 1.052)	0.9808
Eadie-Hofstee \pm SE	1.79 \pm 0.30 (1.49 at 2.09)	1.033 \pm 0.098 (0.935 at 1.131)	0.9310
Carvalho et al. \pm SE	1.60 \pm 0.13 (1.47 at 1.73)	0.978 \pm 0.063 (0.915 at 1.041)	0.9808

Table 1. Kinetic parameters Vmax and KM obtained by different methods of linear regression (SE: standard error of mean and CI: confidence interval on the mean).

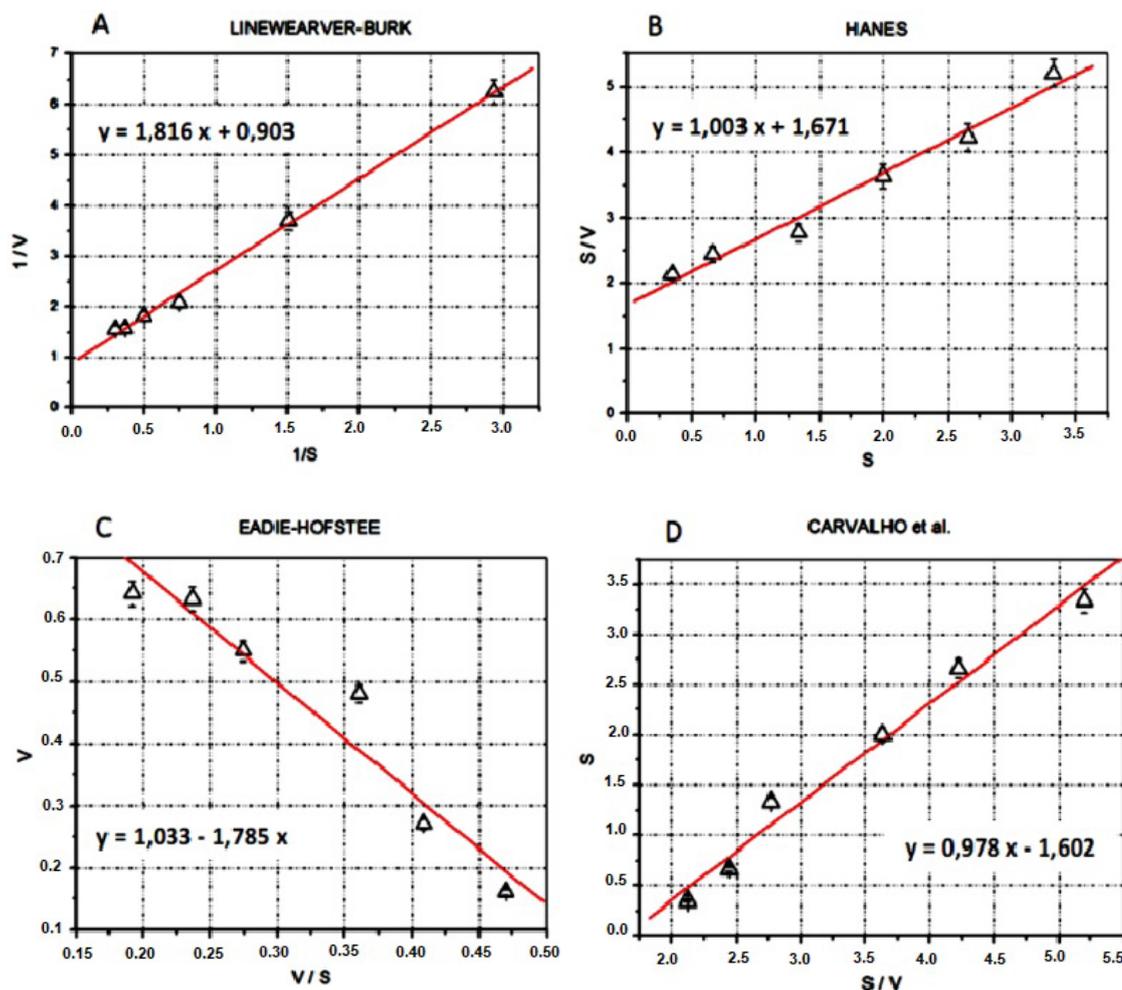


Figure 2. Graphical representations and equations obtained from linear regressions using CMC and enzymatic preparation.

4 | CONCLUSIONS

The results obtained by Hanes and Carvalho et al showed higher enzyme-substrate affinity with better distribution of experimental points, not being influenced by agglomerated points at low concentrations. In Carvalho et al the apparent kinetic parameters K_M and V_{max} are obtained directly by means of the coefficients of the line. In addition, these parameters presented confidence interval values close to the Hanes model for the same confidence level of 95%. Thus, it is believed that in the experimental conditions of this study, Carvalho et al presented as the best linear regression model.

REFERENCES

CARVALHO, N.M.F.; PIRES, B.M.; ANTUNES, O.A.C.; FARIA, R.B. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis Menten. **Química Nova**, v. 33, p. 1607-1611, 2010.

CASTRO, A.M. et al. High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. **Enzyme Research**, p.1–8, 2010.

FERREIRA, N.R. Produção e caracterização do complexo celulolítico de fungos filamentosos naturalmente ocorrentes em moluscos xilófagos (*Neoteredo reynei*). 2012. 101 f. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Pará.

SINGH, R.; KUMAR R.; BISHNOI K.; BISHNOI N. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 28–35, 2009.

PRODUCTION OF COMMON ORANGE FERMENTED BEVERAGE: KINETIC STUDY AND SENSORY ANALYSIS

Jacqueline de Moraes Campêlo

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Engenharia Química
Recife-PE.

Olga Martins Marques

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Engenharia Química
Recife-PE.

ABSTRACT: This study aimed to elaborate a fermented alcoholic beverage of common orange in a discontinuous system. During the fermentation, a kinetic study was performed at 30°C, where *Saccharomyces cerevisiae* was used as inoculum. The process was accompanied by analyzes of biomass, total reducing sugars and ethanol. Sensory analysis of the sweetened and pasteurized beverage was also carried out to estimate its acceptance. The fermentation was concluded in 108 hours, with consumption of 99.21% of the sugars and ethanol productivity of $Pr_p = 0.818$ (g.L⁻¹.h⁻¹). The maximum biomass concentration was 14.31 g/L, with cell productivity of $Pr_x = 0.1325$ (g.L⁻¹.h⁻¹) and maximum specific velocity of $\mu_{max} = 0.017$ h⁻¹. The beverage presented a final alcoholic content of 11.3 °GL, and obtained an excellent acceptance (100%) by the judges. The results suggest applicability orange in the production of fermented alcoholic beverage, generating

opportunity for new economic developments in the northeast region of Brazil.

Key-words: Orange; Fermentation; Kinetic; Sensory.

1 | INTRODUCTION

The production of fermented fruit drinks is rarely explored in our country when considering its vast potential. The development of research in this field is important to test the appropriate technical procedure for each fruit, which requires more detailed studies and determination of appropriate methodology (Venturini Filho, 2010).

Oranges are one of the fruits that are suitable for fermented elaboration because of its high sugar content. Moreover, because it is an abundant raw material, widely diffused, and easily produced in different regions of the country. In addition, Brazil is now the third largest producer of fruits worldwide, with 43 million tons per year, and in turn, the world's largest producer of oranges.

Therefore, the production of alcoholic beverages using fruits is an alternative to reducing loss of perishable fruits, besides being an innovation in the elaboration of fermented beverages. Therefore, incorporating sustainability to the process. The present work

aims to implement a kinetic study of the production process of a common orange fermented drink, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as the inoculation agent. A sensory analysis was also performed to evaluate the product acceptance.

2 | METHODOLOGY

The oranges from this work were purchased at CEASA, in Recife/PE. Pulp removal from the fruit was done manually. Primarily, peel, cores, and seeds were removed. After that, the juice was obtained with the aid of a blender and a sifter for orange bagasse removal. The must was formulated with fruit juice and water, and then it was chaptalized at 20.5 °Brix with sugar. The pH was confirmed at 4.5 with the assistance of a pH meter and therefore the solution was treated for 15 minutes with a 15 mg.L⁻¹ potassium metabisulfite solution. The must was then inoculated with active yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) at the concentration of 2.5 g.L⁻¹. The fermentation was conducted in a 2L-type Biokit discontinuous reactor at temperature of 30 °C, as shown in Figure 1.



Figure 1 – Bioreactor containing common orange must.

The fermentation was followed by analyzes of total reducing sugars (TRS), product quantification (ethanol), pH determination, and acidity determination throughout the growing period. The fermentation was stopped when Brix stabilized. At the end of the fermentation, the product was conserved at 10° C for five days, then filtered, bottled, identified, pasteurized and stored at 5°C, as shown in Figure 2. The must and the fermented beverage were characterized according to pH, titratable acidity (IAL, 2005), reducing sugar (AOAC, 1992), biomass, and alcohol by volume (Zoecklein et al., 1994). The productivity in ethanol (Pr_p) and in cells (Pr_x), maximum specific velocity (μ_{max}), yield (R) and efficiency (ϵ_r) were determined according to Schmidell et al. (2001).



Figure 2 – Common Orange fermented beverage.

Sensory evaluation tests were performed with 30 untrained judges consisting of students, professors and employees of the Federal University of Pernambuco, with ages ranging from 18 to 30 years-old of both sexes. The tasters evaluated the attributes, color, flavor, aroma, texture, and overall impression through a nine-point hedonic scale form (Teixeira, 1987; Cecchi, 2001).

3 | RESULTS

The fermentation took place over the course of 108 hours with consumption of 99.21% of the sugars. At the end of the process, residual sugar stabilized at 1.32 g.L^{-1} and the alcohol content increased to $11.2 \text{ }^\circ \text{GL}$ (Figure 3).

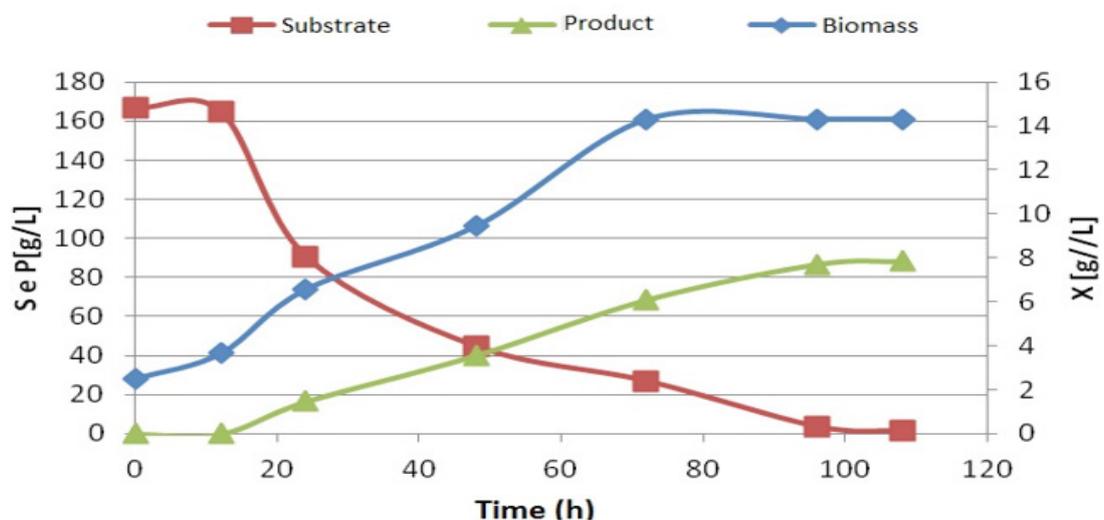


Figure 3- Kinetic evolution of biomass (X), ethanol (P) and reducing sugars (S) throughout the fermentation.

The yield was $R = 47.35\%$, the efficiency was $\epsilon_f = 68\%$ and the ethanol productivity was $Pr_p = 0.818 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. The maximum specific growth rate of *S. cerevisiae* was $\mu_{\max} = 0.017 \text{ h}^{-1}$ and the maximum biomass concentration was 14.31 g/L , with cells yield of $Pr_x = 0.1325 \text{ (g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$. The pH ranged from 4.51 to 3.63, while the acidity increased from 5.19 g.L^{-1} to 8.53 g.L^{-1} towards the end of the fermentation. The reduction in pH results from the production of acids such as lactic acid, acetic acid and succinic acid. The pH variation between 3 and 4 in fermented products is considered a safety level for the growth of microorganisms and this value is of crucial importance, since it can define the resistance of the product to the bacterial infection (Aquarone, 1993; Venturini Filho, 2010).

The beverage produced had alcohol content and acidity compatible with the identity and quality standards for fruit fermented beverages which determined the stability of these beverages. For the sensory analysis, the overall impression attribute presented the highest average (7.91 ± 0.87). The taste had mean (7.86 ± 1.08) and texture had mean (7.86 ± 0.83). The color had an average (7.64 ± 1.05) and the aroma had the lowest mean (7.32 ± 0.95). According to Venturini Filho (2010), customers prefer drinks with darker tonality and sweeter taste. The fermented beverage had 100% acceptance by the judges, thus showing its commercial potential (Figure 4).

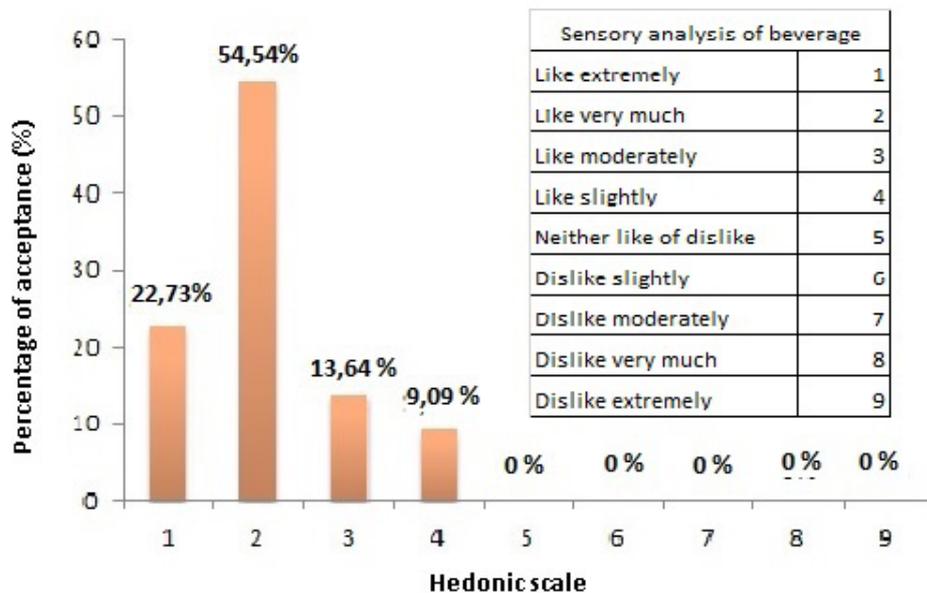


Figure 4- Overall impression chart of the beverage obtained through sensory analysis

4 | CONCLUSION

The results achieved allowed to verify that the product obtained was within the standards established by the legislation for fermented beverages. The sensorial analysis

of the product was quite satisfactory, considering that the obtained fermented beverage presented a clear appearance, a pleasant aroma and flavor, and was accepted by 82% of the interviewees. The production process of the common orange fermented beverage provided a product of high alcohol content and excellent organoleptic properties, indicating the product's promising future in this market little explored.

REFERENCES

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. 1993. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 243 p.

Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Agricultural Chemists**. 12 ed. Washington: A.O.A.C., 1992.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª Ed. N. York, McGraw-Hill, 1986.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia - Engenharia Bioquímica**, v.3. São Paulo:Edgar Blücher Ltda, 1975.

CECCHI, H. M. 2001. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. Editora da UNICAMP, Campinas, São Paulo, p.212.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHIMIDELL, W; LIMA, U. A (org.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. P.21- 66.

IAL – Instituto Adolf Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** - 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolf Lutz,2005. 1018p.

Instituto Brasileiro de Frutas - IBRAF. CNA discute incentivo ao consumo de frutas. Disponível em <http://www.ibraf.org.br/news/news_item.asp?NewsID=7164>. Acesso em Nov. 2015.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

NOBRE, T. P.; HORI, J.; ALCARDE, A. R. **Viabilidade celular de Saccharomyces cerevisiae cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, p. 20-25, 2007.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo- SP. vol. 2. 541p, 2001.

TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C.; JÚNIOR, A. N. M.; LEITÃO FILHO, C. M.; SILVA, C. A. R. **Seasonal variations in infralitoral seaweed communities under a pollution gradient in Baía de Guanabara**, Rio de Janeiro (Brazil). Ciência e Cultura 39:423-428, 1987.

VENTURINI FILHO, W. G. 2010. **Bebidas alcoólicas – ciência e tecnologia**, vol. 1, 1ª edição, São Paulo: Blucher, 2010.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSAN, K.C.; GUMP, B.H. & NURY, F.S. **Wine analysis and production**. New York: Chapman & Hall, 621p., 1994.

MATHEMATICAL MODELING OF GLUCOSE ACCUMULATION DURING ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CARRAGEENAN WASTE

Samuel Conceição Oliveira

UNESP - Universidade Estadual Paulista, FCF
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, DBB -
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.
Araraquara – SP.

Fernando Roberto Paz Cedeno

UNESP - Universidade Estadual Paulista, FCF
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, DBB -
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.
Araraquara – SP.

Fernando Masarin

UNESP - Universidade Estadual Paulista, FCF
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, DBB -
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.
Araraquara – SP.

ABSTRACT: A simple mathematical model based on the experimental data was developed and the best values of kinetic parameters were determined for the enzymatic hydrolysis of the glucan fraction contained in the waste generated by the carrageenan processing of algal biomass (*Kappaphycus alvarezii*) aiming at the glucose accumulation. This residue was subjected to hydrolysis with several commercial enzymatic extracts containing different enzyme loads. A detailed sequence of model development, parameter estimation, and model validation is presented. The temporal profiles of glucose concentration were derived by direct analytical integration of the mathematical model,

obtaining an explicit equation over time. The model adjustment goodness was evaluated by different statistical criteria, including the Fisher's F-test, R^2 -value, and p-value and the accuracy of the model was judged acceptable. The good performance presented by the mathematical model recommends its use in further studies aimed at improving the enzymatic hydrolysis process.

KEYWORDS: mathematical modeling, enzymatic hydrolysis, carrageenan production waste, algal biomass

1 | INTRODUCTION

The third generation of biofuels production bioprocesses are based on the use of algal biomass. *Kappaphycus alvarezii* is a seaweed of high industrial interest since it is used as raw material for carrageenan production. Although there are many industrial applications for carrageenan its main use is in the food industry as a thickening, gelling, stabilizing and suspending agent in water and milk systems (WEBBER et al., 2012; MASARIN et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Enzymatic hydrolysis of the residue generated in the carrageenan production from the macroalgae *K. alvarezii* is a promising

process to produce fermentable monomeric sugars aiming biofuels production. The replacement of fossil fuels by biofuels derived from algae reduces GHG emissions from fuel-driven vehicles. Moreover, the cultivation of algae offers environmental advantage since biomass growth captures CO₂, a greenhouse gas (GHG), from the atmosphere via photosynthesis. These carbon sinks can help to mitigate global warming (GW). Thus, algal biomass is poised to provide many environmental and economic benefits (MASARIN et al., 2016).

However, to render the biofuel production bioprocess economically viable, increases in hydrolysis rates and yields are necessary and require improvement both in enzyme engineering and processing by optimization of reaction conditions, reactor design, enzyme and substrate cocktail compositions, enzyme recycling and recovery strategies (BANSAL et al., 2009). In this scenario, optimization studies, based on mathematical models, become necessary to overcome the technological bottlenecks involved in the entire enzymatic process (OLIVEIRA, et al., 2017).

Mathematical modeling aims to better understand the kinetic behavior of polysaccharides (polymers) hydrolysis in order to develop hydrolytic enzymatic processes that can achieve high yields in glucose and other sugars (monomers) (XIANG et al., 2004). Polysaccharide hydrolysis reactions are very complex, being affected by a series of factors of different natures, starting with the fact that the substrate is in a solid phase and the biocatalyst (enzyme) in a liquid phase, thus comprising a heterogeneous catalytic system (AGUILAR et al., 2002). The past years have seen a significant increase in the number of studies on the kinetics of enzymatic hydrolysis (AGUILAR et al., 2002). Different assumptions regarding rate limiting factors and basic substrate–enzyme interaction mechanisms were employed to develop and validate kinetic models for hydrolysis reactions (AGUILAR et al., 2002).

In this study, the hydrolysis kinetics of glucan (polysaccharide) present in the waste generated in the carrageenan production from the macroalgae *K. alvarezii* was followed by monitoring the concentration of monomer (glucose) formed during reaction and a mathematical model was proposed for description of the concentration temporal profiles experimentally observed.

2 | DEVELOPMENT, IDENTIFICATION, AND VALIDATION OF THE MATHEMATICAL MODEL

Enzymatic hydrolysis of glucan involves the use of cellulase enzymes to convert this polymer into hexoses (glucose). Cellulases are a mixture of three different cellulolytic enzymes, including endoglucanase (1,4-β-D-glucan glucohydrolase), exoglucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase), and cellobiase (β glucosidase), that act synergistically to convert glucan into glucose (WANG et al., 2011).

Due to the difficulty in finding a strict mechanism for hydrolysis reactions, it is

usual to use simplified models, based on a pseudo-homogeneous approach, to describe the kinetics of hydrolysis (AGUILAR et al., 2002). Such a model is that describing the enzymatic hydrolysis as an irreversible first-order reaction, represented by (decomposition of glucose is not considered due to mild reaction conditions):



According to concepts of enzymatic kinetics, the reaction rate (r) can be expressed in terms of either the change of the substrate or the product concentrations (G and g , respectively) as follows:

$$r = - dG/dt = dg/dt \quad (2)$$

Although the rate of enzymatic reactions (r) is generally given as a function of substrate concentration and of enzyme load, according to a Michaelis-Menten type equation, a semi-empirical approach, based on direct inspection of the experimental data, can be used to derive a kinetic expression as follows.

The enzymatic hydrolysis reaction was monitored following the accumulation of glucose over time (Figure 1). The glucose accumulation can be adequately described by a curve that tends to an asymptotic maximum value (Fig. 1). Thus, the rate of glucose accumulation (dg/dt) was assumed to be proportional to the difference between the maximum concentration of glucose (g_{max}), which could potentially be obtained when the reaction time tends to infinite, and that (g) actually present in the reaction medium at a given time t , characterizing a saturation kinetics as follows:

$$dg/dt = r = k(g_{max} - g) \quad (3)$$

In Equation (3), the kinetic constant k incorporates the parameter \hat{k} as well as the enzyme load E_0 used in the hydrolysis reaction. Thus, this parameter can be decomposed into these two factors, i.e., $k = \hat{k}E_0$, where \hat{k} can be interpreted as the specific rate constant per unit of enzymatic load. By introducing this relation into Equation (3) and integrating, one obtains the temporal profile of glucose concentration (g):

$$g = g_{max}(1 - e^{-\hat{k}E_0 t}) \quad (4)$$

The residue generated in the carrageenan production from algal biomass was hydrolyzed with different commercial extracts of cellulases using enzyme loads of 10 and 100 FPU/g-substrate. All hydrolysis trials were conducted in 50 mL Falcon tubes containing a polysaccharide suspension at 2% (w/v) of consistency in 50mM sodium acetate buffer, pH 4.8 under rotary stirring at 120 rpm and temperature of 45°C for 72 h.

Due to the parameters g_{max} and \hat{k} to be derived from a pseudo-homogeneous approach, they incorporate several intervening factors in the hydrolysis kinetics and, for this reason, were estimated for each trial, aiming to incorporate the variations resulting from the different reaction conditions used (enzyme load (EL), extract nature, initial concentrations, etc.). These parameters were estimated for each hydrolysis trial by non-linear regression, minimizing the sum of the squares of the residuals between the experimental values and those calculated by the model, according to the algorithm of Marquardt (FROMENT et al., 2010). Six data points were used for each model

adjustment. The model was validated by means of specific statistical tests, which are described as follows:

- Fisher's F -test: It is based upon the regression sum of squares and the residual sum of squares:

$$F_c = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{\hat{y}_i^2}{p}}{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}} > F(p, n-p; 1-\alpha) \quad (5)$$

In Equation 5, y_i and \hat{y}_i are respectively the experimental and calculated values of glucose concentration at time i , n is the number of experimental data ($n=6$) and p is the number of model parameters ($p=2$). If the calculated value of F (F_c) is greater than the corresponding tabulated value for degrees of freedom p and $n-p$, and probability $1-\alpha$ ($F(p, n-p; 1-\alpha)$), the regression is considered statistically significant, being 0.05 the value commonly adopted for the significance level (α). For all the adjustments performed, the tabulated value of F is $F(2,4; 0.95) = 6.9443$.

- p -value test: According to which, the model is rejected if this value is greater than the significance level (α) set for the test.
- Coefficient of determination (R^2): Provides a fair first indication of how much of the variance in the experimental data is explained by the model.

$$R^2 = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \right] \quad (6)$$

3 | RESULTS AND DISCUSSION

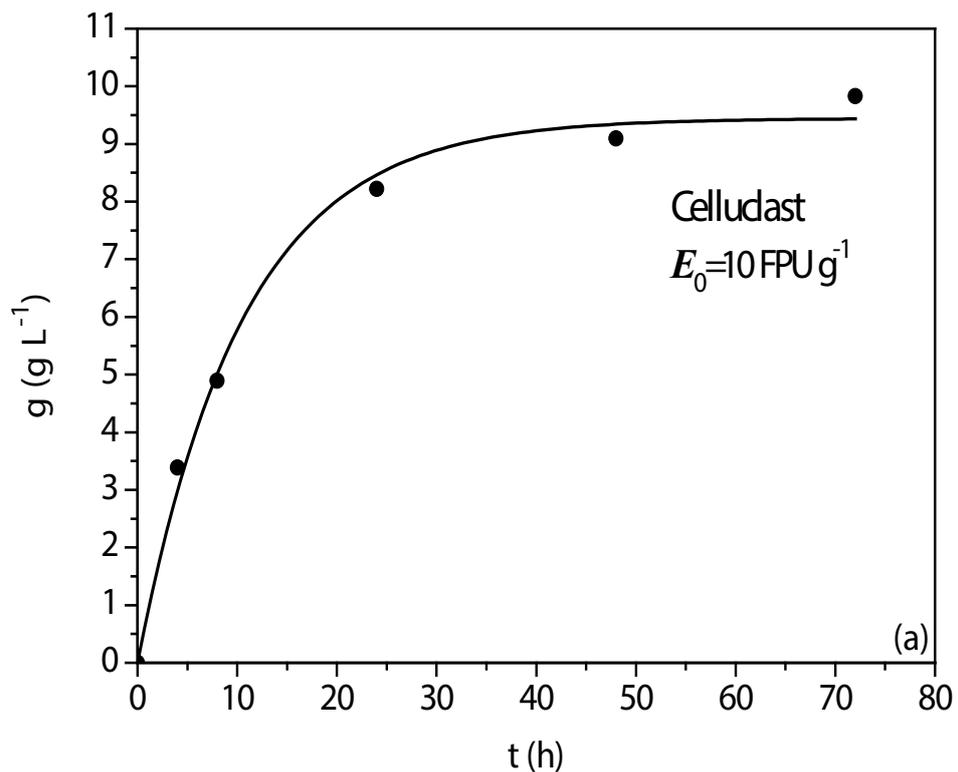
Table 1 presents the parameter estimates and statistics indicators for the kinetic model adjustments to the experimental data obtained for each enzymatic hydrolysis trial.

Enzymatic Extract	E_0 (FPU g ⁻¹)	g_{max} (g L ⁻¹)	\hat{k} (g h ⁻¹ FPU ⁻¹)	k (h ⁻¹)	F_c	p -value	R^2
Cellic CTec2	10	9.63393	0.017734	0.1773	438.997	3.067x10 ⁻⁵	0.979
		(± 0.38007)	(± 0.002774)				
Celluclast	10	9.44459	0.009446	0.0945	1221.606	3.999x10 ⁻⁶	0.994
		(± 0.23912)	(± 0.000851)				
Cellulase from <i>Trichoderma</i>	10	8.48358	0.008242	0.0824	595.822	1.671x10 ⁻⁵	0.988
		(± 0.31863)	(± 0.001070)				
Cellic CTec2	100	8.93941	0.0050265	0.5027	1181.391	4.275x10 ⁻⁶	0.990
		(± 0.21264)	(± 0.0009364)				

Table 1 - Parameter estimates and statistical indicators for the kinetic model adjustments

It is observed that the value of \hat{k} is around $0.01 \text{ g h}^{-1} \text{ FPU}^{-1}$, except for that estimated for the trial performed with the enzymatic extract Cellic CTec2 ($E_0=100 \text{ FPU g}^{-1}$), for which the value of \hat{k} was $0.005 \text{ g h}^{-1} \text{ FPU}^{-1}$, a value about two times smaller than those verified for the other extracts. However, this value of \hat{k} , when linked to the high enzymatic loading used in this trial ($E_0=100 \text{ FPU g}^{-1}$), provided the highest value of k , which significantly increased the reaction rate. The parameter g_{max} was independent on the experimental conditions used, presenting small variations around the average value of 9.12 g L^{-1} .

According to the applied tests, the proposed kinetic model was validated for all trials, presenting statistical indicators that were very favorable to its validation at a probability level above 95%. Based on the R^2 value, graphs below illustrate the best (a) and the worst (b) model fits, which were obtained for the enzyme extracts Celluclast ($E_0=10 \text{ FPU g}^{-1}$) and Cellic CTec2 ($E_0=10 \text{ FPU g}^{-1}$), respectively. The high values assumed by the determination coefficient provide an indication of the suitability of the theoretical approach followed and of the reliability of the related kinetic equations obtained.



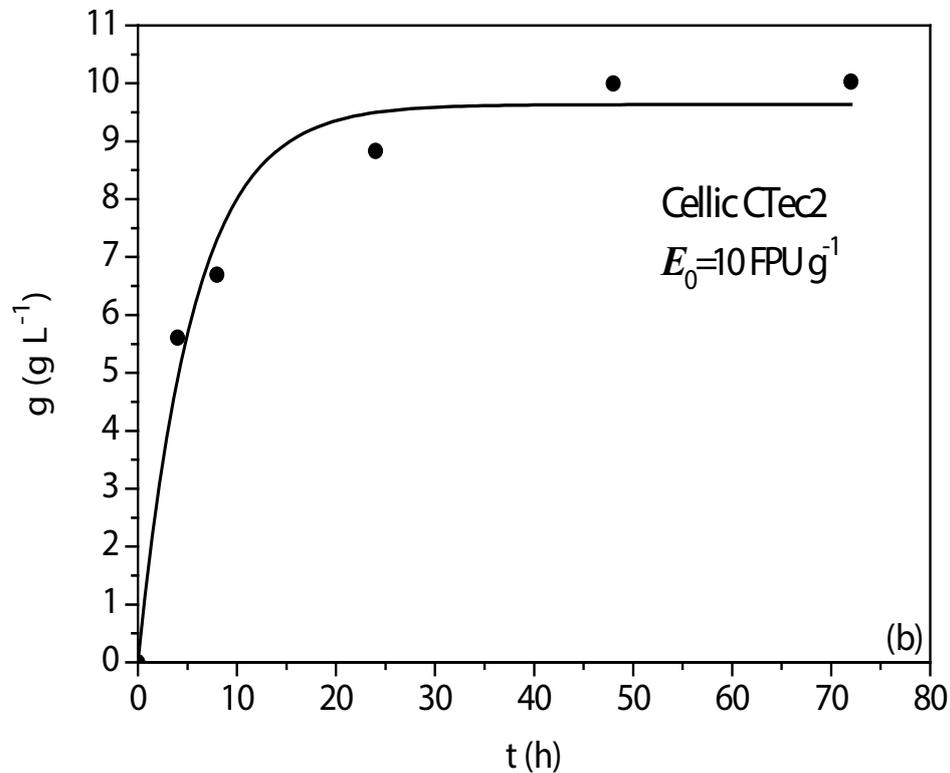


Figure 1 – Illustration of the best (a) and worst (b) adjustments produced by the mathematical model

4 | CONCLUSION

A simple mathematical model was developed to describe the kinetics of enzymatic hydrolysis of the polysaccharide fraction of the residue generated in the carrageenan production process from algal biomass. The proposed model provided adjustments to the experimental data having excellent statistical indicators, thus recommending its use for optimization studies of the enzymatic hydrolysis process. However, the model needs to be further tested against additional experimental data to validate or disprove any underlying hypothesis.

REFERENCES

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. **Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse.** *J Food Eng.*, 55(4), pp. 309–318, 2002.

FROMENT, G. F.; BISCHOFF, K. B.; DE WILDE J. **Chemical Reactor Analysis and Design.** 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 900 p, 2010.

MASARIN, F.; CEDENO, F. R. P.; CHAVEZ, E. G. S.; OLIVEIRA, L. E.; GELLI, V. C.; MONTI, R. **Chemical analysis and biorefinery of red algae *Kappaphycus alvarezii* for efficient production of glucose from residue of carrageenan extraction process.** *Biotechnol Biofuels*, 9:122, 2016.

OLIVEIRA, S. C.; PAZ-CEDENO, F. R.; MASARIN, F. **Kinetic modeling of monomeric sugars formation during the enzymatic hydrolysis of the residue generated in the carrageenan production from algal biomass.** In: Anais do XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos/XII Simpósio

de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Aracaju, 2017.

XIANG, Q.; Lee, Y. Y.; TORGET, R. W. **Kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass.** *Appl Biochem Biotechnol.* 113–116(1), pp. 1127–1138, 2004.

WANG, Z.; XU, J.; CHENG, J. J. **Modeling biochemical conversion of lignocellulosic materials for sugar production: a review.** *BioResources.* 6(4), pp. 5282-5306, 2011.

WEBBER, V.; CARVALHO, S. M.; OGLIARI, P. J.; HAYASHI, L.; BARRETO, P. L. M. **Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 32(4), pp. 812-818, 2012

PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Metarhizium anisopliae* POR CULTIVO SÓLIDO EM BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO COM ROTAÇÃO INTERMITENTE: APLICAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PREDIÇÃO DE PERFIS DE TEMPERATURA

Érika Fernanda Rezendes Tada

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - DETA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Lucas Portilho da Cunha

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - DETA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

João Cláudio Thoméo

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - DETA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

RESUMO: Este capítulo apresenta um estudo preliminar sobre o cultivo sólido do fungo *Metarhizium anisopliae* em arroz pré-gelatinizados em um biorreator de tambor rotativo e as possíveis implicações das rotações sobre a produção de esporos. Primeiramente, são discutidos aspectos da operação deste tipo de biorreator e das

condições de cultivo do fungo; o mecanismo de mistura e movimentação das partículas durante a fermentação é discutido como um mecanismo auxiliar para controle da temperatura durante o processo, a ser aplicado antes ou durante os períodos de sobreaquecimento. Os resultados de produção de esporos em tambor rotativo com rotação intermitente são apresentados em comparação com aqueles obtidos em biorreatores de operação estática, e um modelo matemático foi utilizado para predição de elevações de temperatura. A princípio, as rotações não implicaram negativamente sobre a produção de esporos, sendo em biorreator de tambor rotativo com rotação a cada 24 horas a condição com mais elevada produção e a predição da temperatura pelo modelo proposto foi satisfatória em comparação com perfis experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: *Metarhizium anisopliae*, fermentação em estado sólido, biorreator de tambor rotativo, temperatura, modelagem e simulação.

1 | INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida porosa, que dispõe de água apenas em quantidades suficientes para

suprir as necessidades metabólicas do microrganismo. Através desta tecnologia, é possível se obter produtos de alto valor agregado, tais como aromas, pigmentos, enzimas, ácidos orgânicos e agentes biocontroladores (BHARGAV et al., 2008). Dentre estes, destaca-se a aplicação de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* como alternativa ao uso de inseticidas de origem química para o controle de diversas pragas (DEL BIANCHI et al., 2001).

M. anisopliae é um fungo entomopatogênico classificado como acaricida e que se desenvolve com hifas, nas quais estão micélios e conídios, que são os propágulos ou órgãos de disseminação da espécie em hospedeiros ou em meio de cultura. Quando os propágulos se fixam na cutícula dos hospedeiros, ocorrem diversos fenômenos mecânicos e bioquímicos que consistem na deposição do esporo do fungo na superfície do hospedeiro (cutícula), germinação, penetração, colonização e crescimento do fungo na parte externa do inseto (mumificação do inseto), seguida de esporulação (PEDRINI, 2017; SHIN; BAE; WOO, 2016; ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1991) MW 33 kDa. Dentre as principais pragas sobre as quais o fungo atua estão o carrapato de gado *Rhipicephalus microplu*, a mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*), o inseto *Alphitobius diaperinus* – uma das principais pragas da avicultura –, os piolhos de aves (*Mallophaga sp.*) e a cigarrinha da folha da cana de açúcar (*Mahanarva posticata*). No Brasil, a principal aplicação do fungo se dá no controle desta última praga em virtude da proibição da queima da palha da cana de açúcar (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; ALVES et al., 2004; ARRUDA, 2005; BENELLI et al., 2018; GALINDO-VELASCO et al., 2015; PAULA et al., 2000; POLAR et al., 2005; WASSERMANN et al., 2016; WEBSTER et al., 2017). Segundo pesquisas, o fungo *M. anisopliae* é o fungo mais utilizado para o controle microbiológico na América Latina, seguido pelo emprego do fungo *Beauveria bassiana* (NISHI; SATO, 2017). Porém, a produção industrial dos esporos do fungo *M. anisopliae* ainda é desprovida de tecnologia e processos sofisticados que permitam uma repetição do processo e um controle efetivo durante o cultivo do fungo (CUNHA, 2016).

Como alternativa para melhoria do processo existem diversos estudos que visam a utilização de biorreatores para cultivo sólido. No entanto, o aumento de escala de biorreatores para FES ainda não está totalmente disponível em escala industrial principalmente devido a dificuldades no controle e manutenção de importantes parâmetros de processo, tais como a temperatura e a umidade do substrato. Durante a fermentação, o microrganismo tende a gerar calor proveniente de suas atividades metabólicas. De um modo geral, os substratos utilizados em FES são meios orgânicos com propriedades térmicas relativamente pobres (CASCIATORI et al., 2013), o que dificulta a dissipação do calor gerado, que então permanece acumulado e tende a se manifestar na forma de aumentos de temperatura. Estas elevações na temperatura podem desencadear transportes de massa também indesejáveis, além de efeitos negativos sobre a produção dos compostos de interesse. Neste contexto, os biorreatores devem dispor de mecanismos que auxiliem no controle e manutenção do processo,

tais como introdução de ar, aspersão de água e/ou dispositivos que promovam mistura e movimentação das partículas. Este é um mecanismo muito interessante a ser empregado antes ou durante os períodos de sobreaquecimento do leito, pois promove maiores taxas de transferências de calor e massa, o que minimizaria a ocorrência de gradientes de temperatura.

Este capítulo tem como objetivo apresentar um estudo preliminar sobre a produção de esporos do fungo *M. anisopliae* em biorreator de tambor rotativo em regime de rotação intermitente, utilizada na tentativa de minimizar possíveis gradientes de temperatura e promover maior homogeneidade térmica do leito durante o processo. A seguir, serão apresentados detalhes sobre as configurações típicas deste tipo de biorreator e sobre as condições de cultivo do fungo, bem como a aplicação de um modelo matemático para predição de períodos de sobre aquecimento do leito de partículas.

2 | BIORREADORES DE TAMBOR ROTATIVO: CONFIGURAÇÃO E OPERAÇÃO

Os processos fermentativos ocorrem em reatores biológicos, também conhecidos como biorreatores, que atuam como barreira contra vias de contaminação e possibilitam a manutenção de condições ótimas para o desenvolvimento do microrganismo (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Particularidades na configuração destes equipamentos permitem a classificação dos biorreatores em dois grandes grupos gerais: de leito fixo e de leito móvel. Brevemente e como o próprio nome sugere, as partículas permanecem estáticas durante todo o processo em biorreatores de leito fixo. Dentre os mais utilizados, destacam-se os biorreatores de bandeja e os de coluna empacotada. Como mecanismo de manutenção da temperatura durante o processo, destacam-se a introdução de ar em condições controladas e a preservação das fronteiras espaciais em temperatura controlada. Dorta e Arcas (1998) e Van Breukelen et al., (2011), que realizaram a produção dos esporos em biorreator de coluna empacotada e demonstraram em seus trabalhos dificuldades com empacotamento do substrato e compactação, e observaram gradientes de temperatura axial e radial. Em biorreatores de bandeja, isso é obtido, em geral, pela acomodação das bandejas em câmara com temperatura constante, enquanto que camisas externas de refrigeração são comumente utilizadas em biorreatores de coluna empacotada. Méndez-González et al., (2018) demonstraram sucesso na produção de esporos utilizando biorreator de bandeja, porém os biorreatores utilizados não ultrapassavam capacidade de 500g de substrato, ou seja, realizaram testes em escala laboratorial.

Dentre os biorreatores de leito móvel, os tambores rotativos têm chamado atenção por apresentar facilidades de operação durante o processo. Dentre elas, destaca-se a possibilidade de que todas as etapas sejam desencadeadas dentro do biorreator, desde a inoculação do substrato até a extração da solução bruta de compostos de

interesse, o que minimizaria a demanda por trabalho manual e o contato com possíveis fontes de contaminação externa. Estes biorreatores consistem em cilindros horizontais encamisados que dispõem de mecanismos auxiliares para mistura e movimentação das partículas. Para que a dinâmica de mistura e movimentação não seja prejudicada, estes equipamentos não operam com todo o volume interno preenchido. Na literatura clássica, a razão entre o volume interno total do tambor e o volume preenchido por partículas é denominada grau de enchimento, que pode ser representada em escala unitária ou em porcentagem. Estudos têm apresentado a utilização de tambores rotativos em investigações em FES com até 60% de seu volume interno preenchido por partículas (WANG et al., 2010; GRAJALES et al., 2012; TADA et al., 2017a; TADA et al., 2017b).

Além da camisa externa para refrigeração, os biorreatores de tambor rotativo apresentam a possibilidade de introdução de ar em condições controladas, que atua como mecanismo de remoção de calor por convecção e no suprimento da demanda de oxigênio pelo microrganismo, além da possibilidade de reposição da umidade perdida durante o processo através da aspensão de água e da mistura e movimentação de partículas. Quanto ao ar de entrada, recomenda-se o emprego de ar saturado de vapor d'água na temperatura ótima de crescimento do microrganismo, pois isto evitaria que o ar capturasse umidade proveniente do leito úmido e, conseqüentemente, que o leito sofresse ressecamento ao longo do processo. No entanto, tratando-se da produção de estruturas de resistência, tais como são os esporos, estudos ainda estão sendo desenvolvidos para avaliar a influência da umidade relativa do ar sobre a produção dos esporos.

Duas configurações principais têm sido reportadas na introdução de ar em biorreatores de tambor rotativo, quais sejam, através do espaço vazio acima da superfície do leito de partículas, também chamado de *headspace*, ou através de um tubo localizado em meio ao leito de partículas e perfurado ao longo de seu comprimento. Na Figura 1 estão ilustradas estas duas configurações. Note que, na primeira (Figura 1.a), o escoamento de ar se dá preferencialmente ao longo do comprimento do tambor, uma vez que o ar adentra o sistema por uma extremidade axial e é recolhido na extremidade oposta; enquanto que na Figura 1.b, o escoamento é preferencialmente radial.

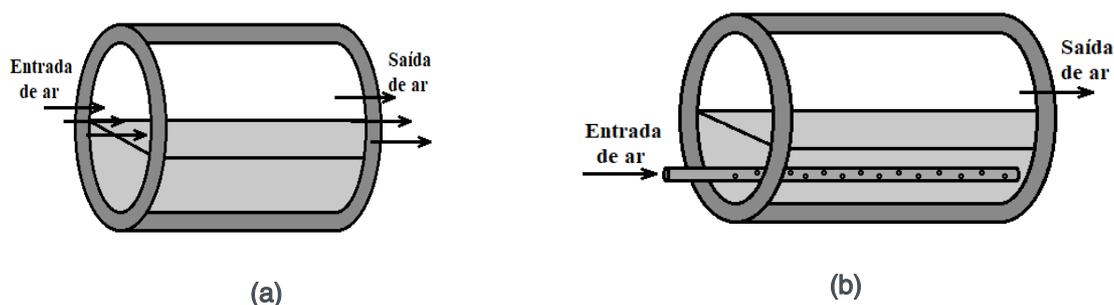


Figura 1 – Configurações para introdução de ar em biorreator de tambor rotativo.

Em processos de origem biológica em que ocorre a elevação da temperatura e, conseqüentemente, a perda das condições ótimas, a movimentação e mistura das partículas apresenta-se como um mecanismo de grande importância para o resfriamento e posterior homogeneização térmica do leito. Durante a rotação do tambor, maiores taxas de transferência de calor e massa entre as fases sólida e gasosa são observadas. A literatura clássica reporta que a convecção é o principal mecanismo de remoção de calor em leitos de partículas úmidas (GRAJEK, 1988).

O movimento das partículas pode ocorrer devido à rotação da parede interna do tambor, ou pelo movimento de dispositivos auxiliares, tais como a presença de pás que descrevem movimento rotacional em torno de seu próprio eixo e, geralmente, são instaladas no centro radial do tambor. Defletores podem ser instalados junto à parede interna do tambor, promovendo a elevação das camadas do leito mais próximas à parede e favorecendo a movimentação e a mistura das partículas. Na Figura 2 estão apresentadas as duas configurações citadas.

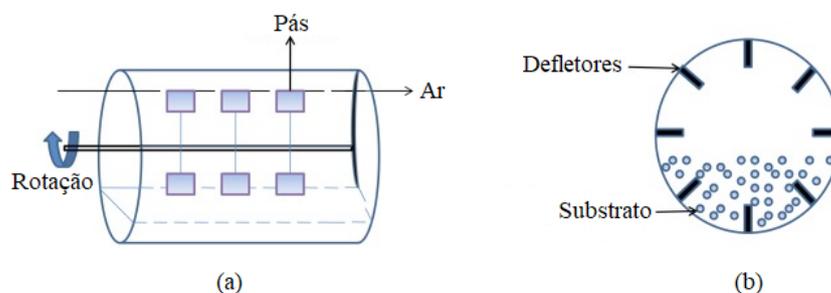


Figura 2 – Configurações de dispositivos auxiliares à mistura de partículas em biorreator de tambor rotativo.

FONTE: Adaptado de Arora, Rani e Ghosh (2018).

O regime de rotação empregado em FES pode variar entre contínuo e intermitente. No primeiro, as rotações são conduzidas durante todo o tempo do processo, enquanto que no segundo, as perturbações são empregadas somente como medida preventiva de controle da temperatura do leito, ou seja, quando elevações de temperatura são esperadas. Assim, o leito é mantido estático e é esporadicamente rotacionado. Em geral, devido à ampla gama de substratos utilizados para FES, cada processo requer o estudo particular do efeito das rotações sobre o rendimento e produtividade dos compostos de interesse, uma vez que, em determinados casos, o cisalhamento excessivo pode promover o rompimento de estruturas de crescimento do microrganismo. Nestes casos, recomenda-se o emprego de rotações em regime intermitente. Nas seções a seguir, serão apresentados um estudo preliminar sobre a influência do cisalhamento sobre a produção de esporos do fungo *M. anisopliae*, seguido de modelagem matemática para predição dos períodos de sobreaquecimento do leito.

3 | CULTIVO SÓLIDO EM BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO

O cultivo sólido do fungo *M. anisopliae* se dá sobre a superfície de partículas de arroz tipo 1, que passam por pré-gelatinização durante processo de autoclavagem a 121 °C, 1,1 atm e 20 minutos. As condições ótimas correspondem a 28 °C, aplicação de ar saturado de vapor d'água também nesta temperatura e vazão de 1 L/min e umidade do substrato na faixa de 56 – 58 %, em base úmida. A vazão de ar refere-se àquela utilizada nos ensaios fermentativos cujos resultados serão mostrados a seguir. No entanto, é evidente que sistemas maiores requereriam maiores vazões de ar.

O fungo é depositado sobre o arroz autoclavado na forma de uma suspensão de esporos em solução de Tween 80 0,1% com concentração de 10^7 esporos/g-sólido seco. O cultivo tem duração de 10 dias e, após isso, os esporos são extraídos pela adição de solução de Tween 80 0,1% ao meio cultivado, seguida de constante movimentação para desprendimento dos esporos. A estimativa da produção de esporos é feita através da contagem de uma alíquota da solução em câmara de Neubauer.

A parede interna do tambor pode ser mantida a 28 °C pela circulação de água nesta temperatura, proveniente de um banho com temperatura controlada; e o ar pode ser saturado e mantido nesta temperatura ao escoar através de uma coluna de umidificação mantida também nesta temperatura. Para o uso desta coluna, recomenda-se o preenchimento de seu interior com água e partículas de material inerte, tal como esferas de vidro, pois a presença das partículas auxilia no tempo de retenção do ar em contato com a água e evita que água seja arrastada para dentro do biorreator. Para cultivo do fungo *M. anisopliae* em arroz para produção de esporos, a literatura tem reportado vazões de ar de 1 a 5 L/min (DORTA; ARCAS, 1998; CUNHA, 2016). A utilização do mecanismo de reposição de umidade é empregada unicamente quando gradientes de concentração de água são instalados no leito de partículas para que sejam evitadas as variações no teor de umidade ao final do processo em relação à umidade inicial.

Quanto à dinâmica de partículas de arroz em tambor rotativo, Grajales et al. (2012) apresentou um estudo sobre mistura e movimentação de arroz pré-gelatinizado em graus de enchimento 23, 43 e 60 %. Os autores constataram que a velocidade de rotação não teve influência sobre o número de rotações para se atingir a mistura radial de partículas no tambor, e recomendam a utilização de 5, 9 e 11 revoluções para cada grau de enchimento, respectivamente. Este é um estudo preliminar de dinâmica de movimentação e mistura de partículas, e sua transposição para a real situação de FES deve ser investigada e observada com cautela, uma vez que a presença do microrganismo pode promover alterações nas características estruturais e reológicas do leito de partículas ao longo do tempo.

Na Figura 3 estão apresentadas fotografias capturadas antes e após 10 dias de cultivo sólido de arroz pelo fungo *M. anisopliae*. O fungo possui aspecto esverdeado que, ao longo do cultivo, coloniza boa parte da superfície exposta das partículas.

A imagem do meio fermentado foi capturada após 10 dias de fermentação em um biorreator de bandeja, ou seja, o leito permaneceu totalmente estático.



Arroz inoculado com a suspensão de esporos



Após 10 dias de cultivo

Figura 3 – Aspectos do meio antes e após 10 dias de cultivo sólido de *M. anisopliae* em arroz tipo 1 pré-gelatinizado.

FONTE: CUNHA, 2016.

Após a inoculação com a suspensão de esporos, o arroz pré-gelatinizado mantém a característica de um sistema particulado sem a formação de blocos ou aglomerados. Após os 10 dias de cultivo, nota-se a formação de blocos e aglomerados e a colonização da superfície do meio. O crescimento do microrganismo é indicado por regiões de coloração predominantemente verde. As regiões amareladas e brancas indicam onde não houve colonização. Estas, em geral, surgem quando existe algum fator limitante ao crescimento, tais como o suprimento de oxigênio, temperatura e umidade do leito, ou quando a superfície do grão não se encontra exposta para colonização, estando em contato com as paredes do biorreator ou com outros grãos. Uma vez que o cultivo deste microrganismo se dá na superfície das partículas, a formação de blocos e aglomerados diminui a área superficial disponível, limitando o crescimento do microrganismo, o que pode resultar em queda na produtividade.

Neste contexto, a mistura e movimentação de partículas em tambor rotativo pode contribuir para o não-surgimento de blocos e aglomerados, além de atuar como mecanismo auxiliar de resfriamento do leito em períodos de sobre aquecimento. No entanto, é necessário se verificar a implicação do emprego de rotações sobre a produção de esporos, como será mostrado a seguir.

4 | INFLUÊNCIA DO CISALHAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPOROS

Na Tabela 1 estão apresentadas as concentrações de esporos obtidas após os 10 dias de cultivo e a massa inicial de substrato seco (M_0) utilizado em fermentações conduzidas em embalagens plásticas, em biorreator de coluna empacotada e em biorreator de tambor rotativo, este último em ausência e em presença de rotações. A

concentração inicial de esporos foi de 10^7 esporos/g-sólido seco em todos os testes, e o grau de enchimento em biorreatores de tambor rotativo foi de 0,5.

Biorreator		Dimensões (cm)	M_0 (g)	Concentração de esporos (esporos/g-ss)
Embalagens plásticas		10 x 20	20	$8,83 \times 10^8$
Coluna empacotada		9,5* x 12,5**	50	$4,56 \times 10^8$
Tambor rotativo	Estático	10* x 20**	500	$7,44 \times 10^8$
	Rotações a cada 24 h		500	$9,40 \times 10^8$

Tabela 1 – Concentração de esporos ao final de 10 dias de cultivo de *M. anisopliae* em arroz pré-gelatinizado em diferentes biorreatores.

* diâmetro interno; ** comprimento.

Dentre os leitos estáticos, maiores concentrações foram verificadas em testes em biorreator de tambor estático, provavelmente devido à oferta de mecanismos de manutenção de temperatura mais efetivos. Bertucci et al. (2017) observou que a estabilidade térmica de um leito de partículas secas de bagaço de cana e de alumina se dá pela predominância da transferência de calor da parede para o interior do leito; então a parede do tambor apresenta grande influência sobre a temperatura do sistema, em comparação com a massa e o volume de partículas envolvidos.

Os testes com rotação a cada 24 horas apresentaram maior concentração de esporos do que o teste controle em embalagens plásticas, o que indica que, aparentemente, o cisalhamento não promoveu danos às estruturas de crescimento do microrganismo. Além disso, estima-se que a periódica movimentação e mistura de partículas tenha evitado a formação de blocos e aglomerados, tornando disponível uma maior área superficial para a colonização do microrganismo.

As fermentações conduzidas em embalagens plásticas são utilizadas para fins de comparação quando os processos ocorrem em biorreatores propriamente ditos. Durante o cultivo, as embalagens plásticas são acondicionadas em câmaras com suprimento e renovação de oxigênio e temperatura controlada. Em geral, considera-se este um resultado-controle devido à pouca quantidade de partículas utilizada e, conseqüentemente, à baixa quantidade de calor gerado durante o processo. Assim, as condições ideais de cultivo são mais facilmente mantidas, enquanto que a eventual queda na produção de esporos quando do processo em biorreatores é atribuída ao funcionamento, operação e atuação do biorreator e seus mecanismos de controle e manutenção das condições ótimas. Evidentemente, existe a possibilidade de se operar com maiores massas de partículas em cultivo em embalagens plásticas, tal como usualmente é feito em uma indústria especializada na produção de esporos em São José do Rio Preto – SP, que utiliza a média 400 g de arroz seco por embalagem. Quando maiores quantidades de substrato são utilizadas, mesmo em embalagens plásticas, aumentos de temperatura podem ser verificados. Na Figura 4 estão apresentados perfis de temperatura obtidos durante o cultivo sólido em embalagens

plásticas com 400 g de substrato seco e em tambor rotativo com rotações a cada 24 horas. A quantidade de partículas secas nos ensaios em tambor rotativo também foi de 400 g.

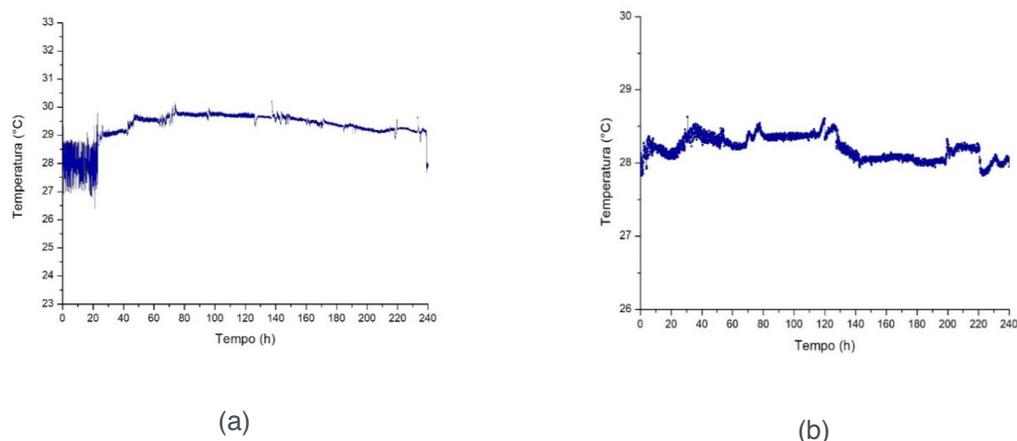


Figura 4 – Perfis de temperatura no centro do leito durante cultivo sólido de *M. anisopliae* em (a) embalagens plásticas e (b) tambor rotativo com rotações a cada 24 horas.

Ao longo das 240 horas de fermentação, nota-se que maiores elevações de temperatura foram verificadas em ensaios em embalagens plásticas em comparação com aqueles em tambor rotativo com rotação intermitente. As temperaturas médias foram de 29,4 °C (Figura 4.a) e 28,3 °C (Figura 4.b), respectivamente. Em relação à produção de esporos, o resultado em embalagens plásticas foi inferior em relação ao obtido em ensaios em tambor rotativo com rotação a cada 24 horas. No entanto, isto pode não estar relacionado somente ao controle da temperatura, mas também à disponibilidade de área superficial para colonização do microrganismo, que é facilitada devido à não formação de blocos e aglomerados em ensaios em tambor rotativo. Superficialmente, pode-se dizer que o aumento de temperatura em 1,4 °C em ensaios em embalagens plásticas não implicou negativamente sobre a produção de esporos, visto que o resultado obtido está entre os mais altos apresentados neste capítulo.

O processo em tambor rotativo apresentou controle da temperatura eficiente, uma vez que a máxima temperatura observada foi de 28,5 °C. Desse modo, entende-se que o emprego de rotações a cada 24 horas foi um mecanismo eficiente para se controlar a temperatura neste sistema. Provavelmente, esta eficiência está relacionada à escala do biorreator em que foi conduzido o experimento (10 cm de diâmetro interno e 20 cm de comprimento). Em escalas maiores, a quantidade de partículas seria também maior, bem como a quantidade de calor gerado. Além disso, o efeito da parede sobre a transferência de calor da parede para o leito de partículas seria minimizado, como reportado por Tada et al. (2017a), ou seja, a parede deixaria de ser um mecanismo tão eficiente no controle da temperatura como é em pequenas escalas (BERTUCCI et al., 2017). Assim, o processo deve ser observado e dimensionado através de estudos de aumento de escala para que os mecanismos adicionais presentes nos biorreatores, tal

como a intermitência de rotações, possam ser utilizados a fim de se conseguir maior estabilidade e homogeneidade térmica ao longo do processo. Modelos matemáticos têm sido aplicados em estudos de aumento de escala de biorreatores para FES, uma vez que a modelagem e simulação destes processos são relativamente mais rápidas e demandam custos inferiores em relação a testes experimentais propriamente ditos.

Especialmente em processos de rotação intermitente, os modelos matemáticos poderiam ser utilizados para prever períodos de sobreaquecimento do leito. Assim, momentos antes ou no momento do sobreaquecimento, rotações poderiam ser empregadas para promover maior contato entre as fases sólida e gasosa no sobre espaço. Modelos clássicos a uma fase têm sido reportados pela literatura para predição de perfis de temperatura (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990; SANGSURASAK; MITCHELL, 1998; FANAEI; VAZIRI, 2009). Na seção a seguir será brevemente apresentada a modelagem das fases estáticas durante o cultivo sólido de *M. anisopliae* em leito de arroz em biorreatores de tambor rotativo com diferentes escalas: 10 e 30 cm de diâmetro interno. Maiores detalhes podem ser consultados em Cunha (2016), Tada et al. (2017b) e na literatura anteriormente mencionada.

5 | MODELAGEM E SIMULAÇÃO EM TAMBOR HORIZONTAL PARCIALMENTE PREENCHIDO COM AERAÇÃO PARALELA À SUPERFÍCIE DO LEITO

Os perfis de temperatura durante as fases estáticas em um biorreator de tambor rotativo com rotações intermitentes podem ser previstos através da solução de um balanço de energia escrito para a geometria de um cilindro parcialmente preenchido. Considerando-se que o ar é introduzido totalmente saturado por vapor d'água na temperatura do processo e que as eventuais transferências de massa entre o ar e o leito são desprezíveis, variações no teor de umidade no leito ao longo do tempo podem ser também desprezadas. Assim, considera-se que o teor de umidade do leito permanece uniformemente distribuída e não promove influências sobre a temperatura do leito.

O balanço de energia está apresentado na Eq. (1). Esta é uma equação diferencial parcial, em que o primeiro termo à esquerda representa a variação de entalpia no leito ao longo do tempo, o segundo termo à direita representa a condução de calor na direção radial e o último termo representa a geração de calor metabólico pelo microrganismo.

$$\rho_l C_{p_l} \frac{\partial T}{\partial t} = K_0 \left[\frac{1}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right] + \dot{g}_c \quad (1)$$

em que ρ_l e C_{p_l} são a densidade e o calor específico do leito, K_0 é a condutividade térmica do leito na estagnação, T é a temperatura, r é a coordenada radial, t é o tempo e \dot{g}_c é o termo que representa a geração de calor. Note que este modelo utiliza

de propriedades diretas do leito de partículas. Considerando que o leito poroso é composto pelas fases sólida úmida e gasosa, estas propriedades incluem as contribuições das referidas fases. Este tipo de modelo é chamado de modelo a uma fase ou pseudo-homogêneo, pois considera que o meio poroso pode ser entendido como um corpo sólido pseudo-homogêneo. As propriedades do leito ρ_l , C_{p_l} e K_0 podem ser determinadas experimentalmente (Casciadori et al., 2013; Casciadori et al., 2014; Prieto, 2003) ou estimadas através das equações a seguir (Fanaei e Vaziri, 2009; Tada et al., 2017a).

$$\rho_l = \varepsilon\rho_a + (1 - \varepsilon)\rho_s \quad (2)$$

$$C_{p_l} = \varepsilon C_{p_a} + (1 - \varepsilon)C_{p_s} \quad (3)$$

$$K_0 = \varepsilon K_a + (1 - \varepsilon)K_s \quad (4)$$

A geração de calor \dot{q}_c relaciona-se com a cinética de crescimento do microrganismo e com o calor liberado durante o crescimento. Na Eq. (5) está apresentado modelo logístico, amplamente utilizado pela literatura em modelagem e simulação de processos de FES (SANGSURASAK; MITCHELL, 1998; FANAEI; VAZIRI, 2009).

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu_g X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad (5)$$

em que X é a concentração de biomassa, X_m é a máxima concentração de biomassa e μ_g é a taxa específica de crescimento. A dependência de μ_g com a temperatura está apresentada nas Eqs. (6) a (8), conforme proposto por Sangsurasak e Mitchell (1998).

$$\text{Para } T \leq T_{\text{ótima}}, \quad \mu_g = \mu_{g,\text{ótima}} \quad (6)$$

$$\text{Para } T_{\text{ótima}} \leq T \leq T_{\text{máx}}, \quad \mu_g = \left[\frac{b + (T_{\text{máx}} - T_{\text{ótima}})}{(T_{\text{máx}} - T_{\text{ótima}})} \right] \left[\frac{\mu_{g,\text{ótima}} (T_{\text{máx}} - T_{\text{ótima}})}{b + (T_{\text{máx}} - T)} \right] \quad (7)$$

$$\text{Para } T \geq T_{\text{máx}}, \quad \mu_g = 0 \quad (8)$$

em que $T_{\text{ótima}}$ é a temperatura do processo, $T_{\text{máx}}$ é a temperatura máxima em que ainda se verifica atividade do microrganismo, $\mu_{g,\text{ótima}}$ é a taxa de crescimento ótima e b é a sensibilidade do crescimento aos aumentos de temperatura.

A Eq. (1) pode ser escrita da seguinte forma, em atenção ao termo de geração de calor :

$$\rho_l C_{p_l} \frac{\partial T}{\partial t} = K_0 \left[\frac{1}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right] + \rho_l R_q \frac{\partial X}{\partial t} \quad (9)$$

em que R_q é a energia liberada por massa de biomassa produzida.

As condições inicial e de contorno para solução da Eq. (9) estão apresentadas a seguir. Esta consiste na solução mais simples para a simulação de transferência de calor em um tambor horizontal parcialmente preenchido por partículas com aeração

paralela à superfície do leito.

$$t = 0, \quad T = T_0 \quad (10)$$

$$r = r_{i(\theta)}, \quad K_0 \frac{\partial T}{\partial r} = h(T - T_a) \quad (11)$$

$$r = R, \quad T = T_p \quad (12)$$

em que as posições $r_{i(\theta)}$ e R representam a superfície do leito e a parede do tambor, respectivamente, h é um coeficiente de transferência de calor por convecção entre a superfície do leito e o ar no sobre espaço e T_0 e T_p são as temperaturas inicial e da parede, respectivamente.

Na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros requeridos pelo modelo. Os parâmetros de crescimento do fungo *M. anisopliae* não serão explicitamente divulgados neste capítulo.

Símbolo	Valor	Fonte
Parâmetros termo físicos		
C_{p_s}	2174 J kg ⁻¹ K ⁻¹	Calculado por Choi e Okos (1986) Perry et al. (2008)
K_s	0,31 W m ⁻¹ K ⁻¹	
ρ_s	1684,3 kg m ⁻³	
C_{p_a}	1005 J kg ⁻¹ K ⁻¹	
K_a	0,21 W m ⁻¹ K ⁻¹	
ρ_a	1,14 kg m ⁻³	
Parâmetros operacionais		
T_0	28 °C	
T_a	28 °C	
T_p	28 °C	
v_a	1 L min ⁻¹	
UR	100%	
X	56 – 58 %	

Tabela 2 – Parâmetros termo físicos requeridos pelo modelo e condições de operação.

Nota: v_a é a vazão de ar e X é a umidade das partículas do leito após inoculação da suspensão de esporos, em base úmida.

O parâmetro h pode ser estimado através de correlações clássicas para escoamento de fluido paralelo à superfície de uma placa plana, tal como apresentado na Eq. (14).

$$Nu = \frac{hL}{K_a} = 0,664Re^{\frac{1}{2}}Pr^{\frac{1}{3}} \quad (14)$$

em que Nu , Re e Pr são os números de Nusselt, Reynolds e Prandtl e L é o comprimento da placa.

A solução numérica do modelo proposto [Eq.(9)] deu-se com a discretização das variáveis espaciais utilizando-se o método das diferenças finitas, de modo que cada elemento de volume ainda apresentasse características gerais do leito de partículas.

As equações diferenciais ordinárias resultantes foram escritas em linguagem MatLab® (MathWorks, Natick, USA) e solucionadas utilizando-se o solver *ode15s* disponível no software. Maiores detalhes sobre a solução para a geometria de um cilindro parcialmente preenchido podem ser encontrados em Tada et al. (2017a).

Na Figura 5 está apresentada a verificação do modelo proposto em comparação com dados experimentais coletados durante fermentação em biorreator de 10 cm. Note que os perfis apresentam proximidade e tendências similares, o que indica que o modelo é capaz de prever os perfis de temperatura ao longo da fermentação.

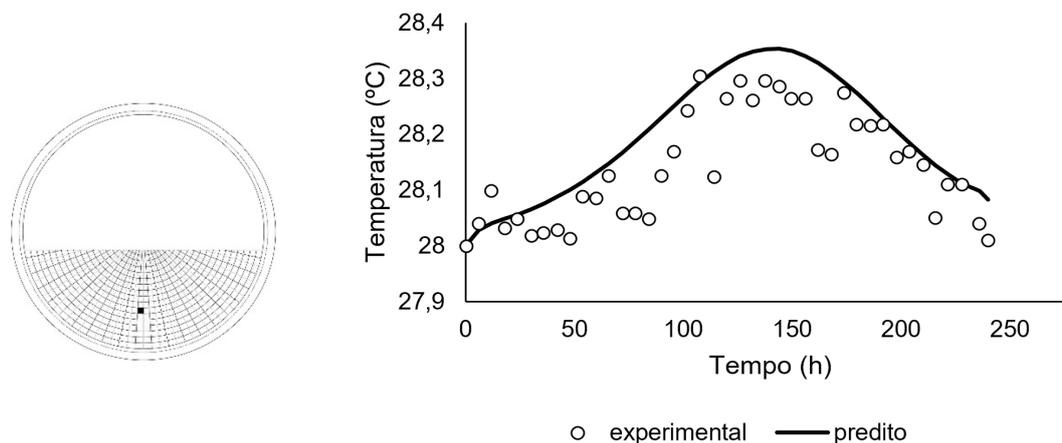


Figura 5 – Comparação entres os perfis de temperatura experimental e predito pelo modelo durante cultivo sólido de *M. anisopliae* em partículas de arroz pré-gelatinizado em biorreator de tambor rotativo mantido totalmente estático e preenchido com grau de enchimento 0,5.

Na Figura 6 estão apresentados os perfis temporais de temperatura obtidos por simulação para o cultivo sólido de *M. anisopliae* em biorreatores de tambor rotativo totalmente estático com 10 e 30 cm de diâmetro interno para o grau de enchimento 0,5. Note que estas simulações foram conduzidas considerando-se o leito totalmente estático, portanto rotações não foram empregadas.

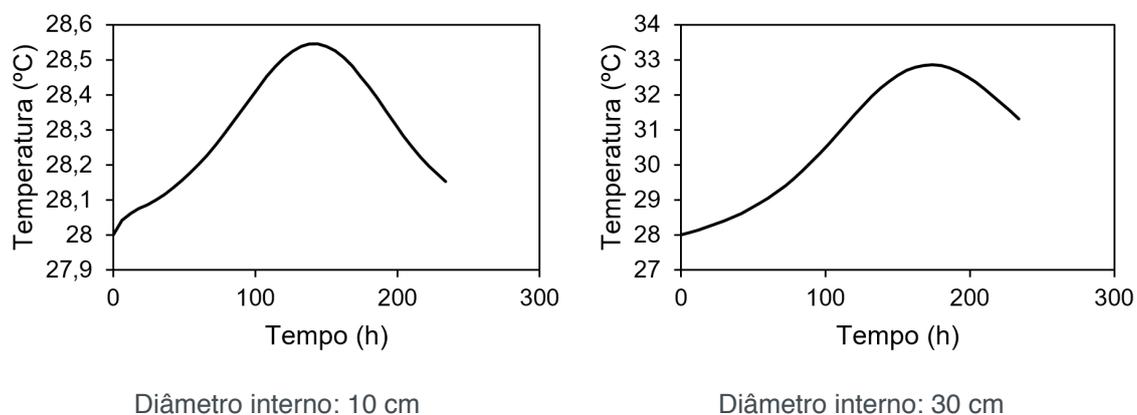


Figura 6 – Perfil temporal de temperatura simulado para cultivo sólido de *M. anisopliae* em leito de arroz pré-gelatinizado colocado em biorreator de tambor rotativo mantido totalmente estático com 10 cm de diâmetro interno, em uma posição central do leito de partículas e grau de enchimento de 0,5.

Em um tambor com 10 cm de diâmetro, a elevação máxima de temperatura

verificada ao longo do tempo foi de 0,5 °C e o perfil de temperatura apresentou uma tendência parabólica com concavidade para baixo, bem como para o tambor com diâmetro de 30 cm. O decréscimo de temperatura a partir de 170 horas indica que os mecanismos de dissipação de calor são mais influentes do que o calor gerado pelo microrganismo. Ao final das 240 horas, a temperatura no biorreator menor foi praticamente reestabelecida aos 28 °C, enquanto que o mesmo não foi verificado para o biorreator maior, que permaneceu todo o tempo a partir das 60 horas iniciais em temperatura superior a 29 °C. Pode se dizer que as elevações de temperatura no biorreator menor foram toleráveis e podem ser consideradas desprezíveis. Desse modo, diz-se que os mecanismos de controle neste sistema foram eficientes e que não seria necessária a aplicação de rotações como mecanismo para potencializar as taxas de transferência de calor, mas talvez o emprego das rotações poderia ser utilizado para evitar a formação de aglomerados e aumentar a área superficial disponível para o microrganismo. Na Figura 7 estão apresentados perfis espaciais de temperatura nos leitos durante o cultivo sólido em biorreatores de 10 e de 30 cm de diâmetro interno preenchidos em grau de enchimento 0,5.

Já no biorreator de 30 cm de diâmetro, as rotações poderiam ser utilizadas na tentativa de promover o resfriamento do leito, visto que esta ferramenta não promove impactos negativos sobre a produção de esporos. A quantidade de calor transferida das partículas para a fase gasosa durante a movimentação é de difícil estimativa em tipos de modelos tal como o apresentado neste capítulo, pois a simulação da movimentação de partículas requer outros métodos numéricos, como o método dos elementos discretos (DEM) (SANTOS et al., 2016). Ademais, o modelo apresentado neste capítulo pode ser utilizado sem maiores problemas na simulação das fases estáticas da fermentação sólida em um biorreator de tambor rotativo com rotação intermitente, e então, a resposta gerada poderia ser empregada em simulações utilizando-se DEM para predição dos perfis de temperatura em regime intermitente de rotação.

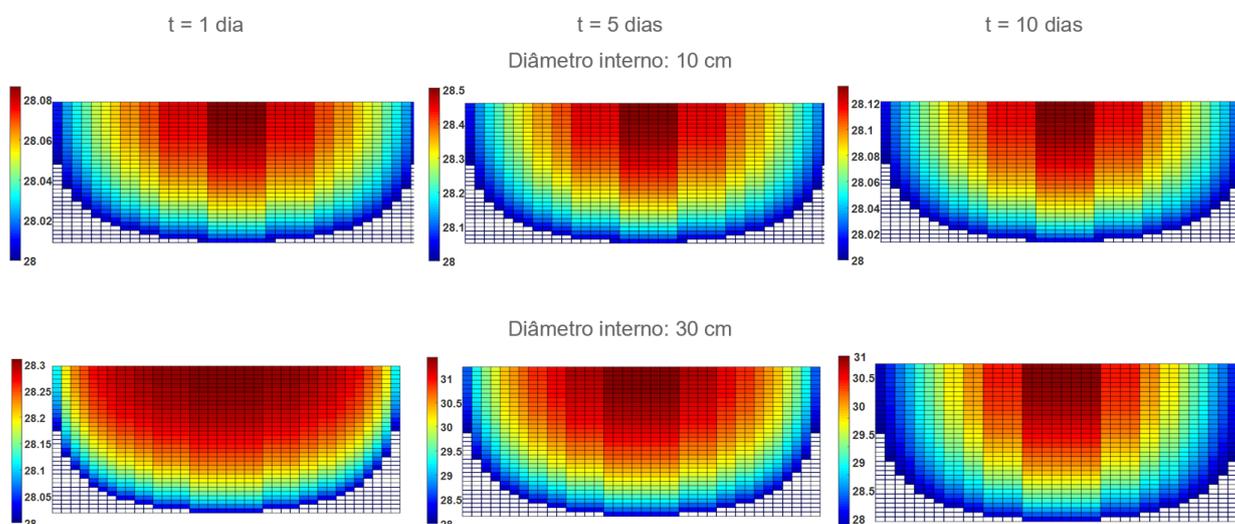


Figura 6 – Perfis espaciais de temperatura em biorreatores de tambor rotativo totalmente estáticos durante cultivo sólido de *M. anisopliae* em arroz pré-gelatinizado em grau de enchimento 0,5.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-DÍAZ, M. A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; GRAGOSO-SÁNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3–4, p. 336–340, 2007.
- ALVES, L. F. A.; ALVES, V. S.; BRESSAN, D. F.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 793–795, 2004.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S.. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of biotechnology*, v. 269, p. 16-34, 2018.
- ARRUDA, W. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOFISIOLÓGICA DE DIFERENTES ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* E ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PROCESSO DE INFECÇÃO EM *Boophilus microplus* Caracterização Molecular e Morfofisiológica de Diferentes Isolados do. 2005.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 22, n. 1, p. 49-70, 2008.
- BENELLI, G.; CASELLI, A.; DI GIUSEPPE, G.; CANALE, A. Control of biting lice, Mallophaga – a review. **Acta Tropica**, v. 177, n. June 2017, p. 211–219, 2018.
- BERTUCCI, V. F.; TADA, É. F. R.; THOMÉO, J. C. Modelagem e simulação de transferência de calor em tambor horizontal parcialmente preenchido com partículas orgânicas. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, v. 1, n. 4, 2017.
- CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; LOPES, K. C. M.; SOUZA, A. G.; THOMÉO, J. C. Stagnant effective thermal conductivity of agro-industrial residues for solid-state fermentation. *International journal of food properties*, v. 16, n. 7, p. 1578-1593, 2013.
- CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. *Chemical Engineering Journal*, v. 255, p. 214-224, 2014.
- CUNHA, L.P. **Aspectos de engenharia da produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em biorreator de bandeja**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, 2016.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M.F. Fermentação em estado sólido. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. Engenharia Bioquímica. São Paulo. Ed. Edgard Blücher. Cap 13. v.2, 2001.
- DORTA, B.; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7–8, p. 501–505, 1998.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, 2003.
- FANAELI, M. A.; VAZIRI, B. M. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 1, p. 446-451, 2009.

GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; CRUZ-VÁZQUES, C.; PESCADOR-RUBIO, A.; ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; OJEDA-CHI, M. M.; CONTRERAS-LARA, D. Efficacy of entomopathogenic fungi (Ascomycetes: Hypocreales) against adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) under stable conditions in the Mexican dry tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3–4, p. 173–178, 2015.

GRAJALES, L. M.; XAVIER, N. M.; HENRIQUE, J. P.; THOMÉO, J. C. Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. **Powder Technology**, v. 222, p. 167-175, 2012.

GRAJEK, W. Cooling aspects of solid-state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n. 6, p. 675-679, 1988.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, F.; LOERA-CORRAL, O.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Chapter 7 – Bioreactors for the Production of Biological Control Agents Produced by Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 109–121, 2018.

NISHI, O.; SATO, H. Species diversity of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride* species complexes isolated from insects in Japan. **Mycoscience**, v. 58, n. 6, p. 472–479, 2017.

PAULA, A.; JUNIOR, I. D. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117–125, 2000.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, p. 1–10, 2017.

POLAR, P.; MAURO, M. A.; KAIRO, M. T.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A.; ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 159–167, 2005.

PRIETO, M. G. S. Alternativas de cogeração na indústria sucro-alcooleira: estudo de caso. 2003. 282 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. The investigation of transient multidimensional heat transfer in solid state fermentation. **The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal**, v. 60, n. 1-3, p. 199-204, 1995.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 6, p. 739-749, 1998.

SANTOS, D. A.; BARROZO, M. A.; DUARTE, C. R.; WEIGLER, F.; MELLMANN, J. Investigation of particle dynamics in a rotary drum by means of experiments and numerical simulations using DEM. **Advanced Powder Technology**, v. 27, n. 2, p. 692-703, 2016.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 8, p. 802-808, 1990.

SHIN, T. Y.; BAE, S. M.; WOO, S. D. Screening and characterization of antimicrobial substances originated from entomopathogenic fungi. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1053–1059, 2016.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate**

Pathology, v. 58, n. 3, p. 415–426, 1991.

TADA, É. F. R.; BÜCK, A.; CASCIATORI, F. P.; TSOTSAS, E.; THOMÉO, J. C. Investigation of heat transfer in partially filled horizontal drums. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 988-1003, 2017a.

TADA, É. F. R.; GRAJALES, L. M.; LEMOS, Y. P.; THOMÉO, J. C. Mixture and motion of sugar cane bagasse in a rotating drum. **Powder Technology**, v. 317, p. 301-309, 2017b.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

VAN BREUKELEN, F. R. et al. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 751–757, 2011.

WANG, E. Q.; LI, S. Z.; TAO, L.; GENG, X.; LI, T. C. Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation. **Applied Energy**, v. 87, n. 9, p. 2839-2845, 2010.

WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L.; MACKENSTEDT, U. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 768–771, 2016.

WEBSTER, A.; PRADEL, E.; SOUZA, U. A.; MARTINS, J. R.; RECK, J.; SCHRANK, A.; KLAFKE, G. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 270–274, 2017.

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE EFETIVIDADE PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS USANDO MÉTODOS DE REGRESSÃO SIMBÓLICA VIA PROGRAMAÇÃO GENÉTICA

Félix Monteiro Pereira

USP - Universidade de São Paulo, EEL - Escola de Engenharia de Lorena, LOQ - Departamento de Engenharia Química. Lorena – SP.

Luciano Eduardo Gomes Junior

USP - Universidade de São Paulo, EEL - Escola de Engenharia de Lorena, LOQ - Departamento de Engenharia Química. Lorena – SP.

Fabício Maciel Gomes

USP - Universidade de São Paulo, EEL - Escola de Engenharia de Lorena, LOQ - Departamento de Engenharia Química. Lorena – SP.

Messias Borges Silva

UNESP - Universidade Estadual Paulista, FEG - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, DP - Departamento de Produção. Guaratinguetá – SP.

Samuel Conceição Oliveira

UNESP - Universidade Estadual Paulista, FCF - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, DBB - Departamento de Biotecnologia. Araraquara – SP.

RESUMO: A abordagem fenomenológica utilizada na modelagem e simulação de biorreatores contendo enzimas imobilizadas envolve a descrição dos fenômenos de difusão e reação de substratos e produtos no interior das partículas catalíticas. Essa descrição é realizada por meio de equações diferenciais de balanços de massa, as quais requerem o uso de métodos numéricos complexos para as suas resoluções.

Uma proposta visando reduzir esse esforço computacional consiste no uso de métodos de regressão simbólica via programação genética para a obtenção de equações empíricas capazes de estimar os principais parâmetros relacionados ao fenômeno de difusão-reação. Um parâmetro importante utilizado no projeto de reatores enzimáticos heterogêneos é o fator de efetividade, o qual representa a razão entre a velocidade média de reação no interior da partícula sujeita a limitações difusionais e aquela na superfície da partícula. O problema abordado neste estudo consiste na determinação do fator de efetividade para partículas catalíticas esféricas em condições isotérmicas e estacionárias cuja cinética de reação é dada pela equação de Michaelis-Menten. Os dados de fator de efetividade utilizados na regressão simbólica foram gerados a partir de uma abordagem fenomenológica do problema de difusão-reação, empregando-se o método de colocação ortogonal em elementos finitos para a resolução do problema de valor no contorno resultante do balanço de massa de substrato no interior das partículas. A equação obtida por regressão simbólica apresentou erros percentuais médio e máximo de 1,0 % e 3,5 %, respectivamente e $R^2=0,9996$, indicando uma excelente qualidade de ajuste aos dados utilizados na regressão.

PALAVRAS-CHAVE: inteligência artificial,

regressão simbólica, enzimas imobilizadas, fator de efetividade catalítica, processo de difusão-reação.

ABSTRACT: The phenomenological approach used in the modeling and simulation of bioreactors containing immobilized enzymes implies the description of the phenomena of diffusion and reaction of substrates and products inside the catalytic particles. This description is performed using the differential equations obtained from mass balances, which require the use of complex numerical methods to solve them. A proposal to reduce this computational effort comprises in the use of symbolic regression by genetic programming to obtain empirical equations able to estimate the main parameters related to the diffusion-reaction phenomenon. An important parameter used in the design of heterogeneous enzymatic reactors is the effectiveness factor, which represents the quotient between the average reaction rate within the particle subject to diffusion limitations and that one at the particle surface. The problem approached in this study is the calculation of effectiveness factor for spherical catalytic particles under isothermal and stationary conditions whose reaction kinetics is given by the Michaelis-Menten equation. The data for effectiveness factor used in the symbolic regression were generated from a phenomenological approach about the diffusion-reaction problem, using the method of orthogonal collocation on finite elements to solve the boundary value problem from the mass balance of substrate within the particles. The equation obtained by symbolic regression presented mean and maximum percentage errors of 1.0% and 3.5%, respectively, and $R^2 = 0.9996$, indicating an excellent fit quality to the data used in the regression.

KEYWORDS: artificial intelligence, symbolic regression, immobilized enzymes, catalytic effectiveness factor, diffusion-reaction process.

1 | INTRODUÇÃO

Os principais objetivos no desenvolvimento de novos processos utilizando agentes biológicos, como células e enzimas, incluem a manufatura de novos produtos, a melhoria da qualidade dos produtos existentes, a minimização de impactos ambientais e a redução de custos (PEREIRA *et al.* 2018, OLIVEIRA *et al.*, 2018; ŠEKULJICA *et al.*, 2016).

Os bioprocessos incluem a transformação de matérias-primas, ou substratos, em produtos no interior de biorreatores empregando células ou enzimas. A seleção do agente da biotransformação e do modo de operação dos biorreatores depende das vantagens e desvantagens apresentadas pelas possíveis configurações operacionais (DORAN, 2013; ILLANES, 2008).

O uso de enzimas livres em biorreatores apresenta como principal desvantagem a dificuldade de recuperação do biocatalisador para reuso no processo. Considerando que um dos fatores limitantes para a utilização de processos enzimáticos de produção reside justamente no custo das enzimas, a reutilização desses biocatalisadores pode

se tornar um fator decisivo para a viabilidade técnica-econômica do processo. A forma mais conveniente e eficiente de reutilização de enzimas é imobilizando-as em matrizes sólidas (ILLANES, 2008).

Biorreatores que operam com enzimas imobilizadas são empregados em diversos processos industriais tais como o tratamento de efluentes e a produção de vários produtos, incluindo fármacos, insumos químicos, alimentos, bebidas, biocombustíveis, enzimas e outros (ŠEKULJICA *et al.*, 2016; EDET *et al.*, 2013).

As vantagens apresentadas pela imobilização de enzimas têm levado ao desenvolvimento de processos industriais empregando reatores enzimáticos heterogêneos, nos quais fenômenos de transferência de massa e de partição do substrato tornam-se importantes de ser entendidos. Conseqüentemente, a modelagem dos fenômenos de difusão e reação de substratos e produtos no interior das partículas catalíticas passa a ser uma etapa relevante no projeto, otimização e controle de reatores enzimáticos heterogêneos (PEREIRA; OLIVEIRA, 2016).

Um parâmetro importante na análise dos efeitos de transferência de massa sobre o comportamento de reatores heterogêneos é o fator de efetividade, um parâmetro variando entre 0 e 1 que indica o quanto a velocidade média de reação no interior da partícula catalítica é controlada pela resistência à difusão nos poros. Para a determinação do fator de efetividade é necessário resolver as equações de balanço de massa no interior da partícula utilizando métodos numéricos complexos que exigem um elevado esforço computacional, especificamente quando se calculam os perfis axiais de concentração ao longo do biorreator, pois o problema da partícula terá que ser resolvido a cada incremento de comprimento do reator (PEREIRA; OLIVEIRA, 2016).

Visando reduzir o esforço computacional exigido pela resolução do problema via abordagem fenomenológica, este estudo propõe uma abordagem empírica para a resolução do problema baseada em métodos de regressão simbólica via programação genética para obter uma equação explícita que permita a determinação do fator de efetividade em função das condições reacionais utilizadas. Tais métodos de regressão encontram-se implementados no software *Nutonian Eureka Formulize* da empresa de desenvolvimento de ferramentas de inteligência artificial *DataRobot*.

Na regressão simbólica via programação genética, as populações de equações são criadas geneticamente, usando o princípio darwiniano de sobrevivência do mais forte ou, no caso da regressão simbólica, a equação com melhor ajuste segundo critério estatístico pré-definido. Por meio deste processo, tanto a forma funcional como os coeficientes numéricos da equação de regressão são determinados por um mecanismo evolutivo, utilizando os operadores genéticos de cruzamento e mutação. Geralmente, nos algoritmos evolutivos, a modificação de uma solução individual de uma população é feita após um número de execuções em cada geração, a fim de encontrar a solução mais adequada. Os elementos no conjunto de funções podem incluir operações aritméticas (+, -, *, /, etc.), funções matemáticas (*exp*, *log*, *cos*,

sin, tan, etc.), condicionais (*If-Then-Else*) e operações booleanas (*AND, OR e NOT*) (BARMPALEXIS, 2011; HAERI *et al.*, 2017).

2 | MODELAGEM FENOMENOLÓGICA

Durante a conversão em processos catalíticos utilizando enzimas imobilizadas, o fluxo líquido de substrato para o interior da partícula, no caso de transporte controlado pela difusão, é promovido por um gradiente de concentração de substrato. Dessa forma, o perfil de concentração de substrato no interior da partícula no estado estacionário dependerá do equilíbrio entre a taxa de conversão e as taxas de transporte. Dessa forma esse perfil dependerá do tamanho das partículas, da quantidade de enzimas, da cinética de reação, da porosidade da partícula e da difusividade do substrato no interior da partícula (VAN ROON *et al.*, 2006).

Como resultado dos gradientes de concentração no interior da partícula, o biocatalisador (enzima imobilizada + suporte) opera em concentrações distintas daquelas do meio externo à partícula, o que é globalmente avaliado por meio de um fator de efetividade, calculado como sendo a razão entre a velocidade média de consumo de substrato nas condições internas e a velocidade de consumo nas condições externas à partícula como no caso de enzimas livres (VAN ROON *et al.*, 2006).

Em determinadas condições de reação-difusão, especialmente quando a resistência à difusão e a velocidade de reação são relativamente altas, a concentração de substrato pode ser nula em uma dada região do biocatalisador (enzima imobilizada + suporte poroso), como mostrado na Figura 1. Nesta região, chamada de núcleo morto, a reação enzimática não ocorrerá por falta de substrato. Portanto, os reatores projetados assumindo que toda a massa de biocatalisador seja ativa apresentarão, na prática, desempenhos inferiores àqueles esperados, justificando, nestes casos, a utilização de um modelo matemático apropriado para o projeto desses reatores que operam sob condições de limitação por transferência de massa (PEREIRA; OLIVEIRA, 2016).

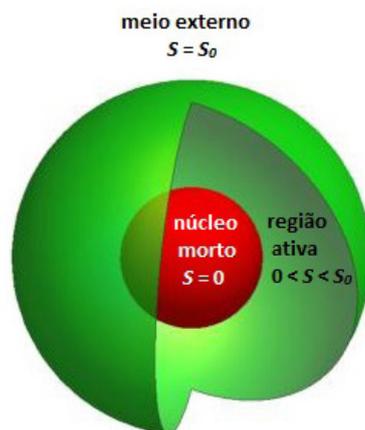


Figura 1 - Representação do núcleo morto em um biocatalisador poroso de geometria esférica.

O balanço de massa de substrato no interior de partículas catalíticas esféricas sob condições isotérmicas e estacionárias e cinética de reação de Michaelis-Menten pode ser generalizado pela Equação 1, na qual: D_{ef} é o coeficiente de difusão efetivo de substrato no interior da partícula, R é a coordenada radial, v_{max} é a velocidade máxima de consumo de substrato, S é a concentração de substrato em um determinado ponto no interior da partícula e K é a constante de Michaelis-Menten (BAILEY, OLLIS, 1986; DORAN, 2013; FOGLER, 2006; OLIVEIRA, 1999; PEREIRA, OLIVEIRA, 2016).

$$D_{ef} \left(\frac{d^2 S}{dR^2} + \frac{2}{R} \frac{dS}{dR} \right) = \frac{v_{max} S}{K + S} \quad (1)$$

A Equação 1 pode ser escrita em termos de parâmetros adimensionais, resultando na Equação 2 (PEREIRA; OLIVEIRA, 2016):

$$\frac{d^2 s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{ds}{dr} = \frac{\alpha^2 \phi^2 (1 + \beta) s}{\beta + s} \quad (2)$$

Na Equação 2: $r = R / R_p$; $s = S / S_0$; $\phi = R_p^2 v_{max} / \{9 D_{ef} S_0 (1 + \beta)\}$, $\beta = K / S_0$, R_p é o raio da partícula, S_0 é a concentração de substrato na superfície da partícula, considerada como sendo igual à do meio fluido nos casos em que a resistência à transferência de massa externa à partícula pode ser desprezada e ϕ é o módulo de Thiele, cujo quadrado representa a razão entre a taxa de reação e a taxa de difusão, ambas avaliadas nas condições de superfície da partícula.

A Equação 2 está sujeita às condições de contorno dadas por:

$$\frac{ds}{dr} = 0 \quad , \text{ em } r = 0, \text{ para } \phi \leq \phi_{crit} \quad (3)$$

$$\frac{ds}{dr} = 0 \quad , \text{ em } r = a, \text{ para } \phi > \phi_{crit} \quad (4)$$

$$s = 1 \quad , \text{ em } r = 1 \quad (5)$$

Nas Equações 3 e 4, a é um parâmetro espacial adimensional, medido a partir do centro da partícula ($r=0$), que define o raio da região esférica correspondente ao núcleo morto (Figura 1), ϕ_{crit} é o valor crítico do módulo de Thiele acima do qual haverá ocorrência do núcleo morto (OLIVEIRA, 1999; PEREIRA, OLIVEIRA, 2016).

As Equações 2-5 constituem um problema de valor no contorno cuja solução permite determinar o fator de efetividade (η) conforme a Equação 6 (OLIVEIRA, 1999; PEREIRA, OLIVEIRA, 2016; PEREIRA, 2008).

$$\eta = \frac{1}{\alpha \phi^2} \left. \frac{ds}{dr} \right|_{r=1} \quad (6)$$

Pereira e Oliveira (2016) mostraram que o método mais confiável para a determinação do fator de efetividade em problemas de difusão-reação é o método da colocação ortogonal em elementos finitos, o qual foi empregado para gerar dados de fator de efetividade a serem utilizados na regressão simbólica.

O método da colocação ortogonal em elementos finitos é de implementação complexa e possui uma velocidade de convergência baixa, limitando as possibilidades de sua aplicação em simuladores de processo amplamente utilizados para o projeto, operação e otimização de plantas industriais (PEREIRA; OLIVEIRA, 2016; RAMIREZ, 1998). Para contornar este problema, uma abordagem empírica de modelagem utilizando uma ferramenta de inteligência artificial, denominada de regressão simbólica, é apresentada a seguir.

3 | MODELAGEM EMPÍRICA

Para problemas envolvendo a ocorrência de núcleo morto não são reportadas na literatura soluções analíticas para o problema de valor no contorno referente à cinética de Michaelis-Menten. Para casos no qual este núcleo não ocorre, algumas soluções analíticas aproximadas, baseadas em expansões em série de polinômios e em métodos matemáticos tais como o da homotopia, foram apresentadas (MAHALAKSHMI; HARIHARAN, 2016; DEVI *et al.*, 2015; SHANTHI *et al.*, 2013; JOY *et al.*, 2011). Entretanto, nenhum desses métodos possui a capacidade de resolver o problema para todas as condições de difusão-reação possíveis.

As pesquisas na área de inteligência artificial possibilitaram o desenvolvimento de uma metodologia para a busca de modelos matemáticos com pouca ou nenhuma influência do pesquisador, baseada na regressão simbólica por algoritmos evolutivos (genéticos) (KHALID *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2016).

A regressão simbólica é um tipo de análise de regressão que busca aleatoriamente as expressões matemáticas que melhor se ajustam a um determinado conjunto de dados levando em consideração tanto a qualidade do ajuste quanto a simplicidade dos modelos obtidos (WASIK *et al.* 2015).

A principal diferença entre a regressão tradicional e a regressão simbólica é que, na tradicional os parâmetros de um modelo pré-estipulado são otimizados enquanto que, na simbólica, tanto os parâmetros quanto a construção do modelo são otimizados (FARIS; SHETA, 2015).

A regressão simbólica tem como desvantagens possuir um espaço infinito para a busca do modelo, além de um número também infinito de modelos que se ajustam perfeitamente a um conjunto de dados finitos. Este fato acarreta em um esforço computacional e um tempo de busca do modelo superior ao da regressão tradicional (VLADISLAVLEVA *et al.*, 2009).

A regressão simbólica tem como principal vantagem o fato de possibilitar

a utilização de algoritmos evolutivos que requerem diversidade para explorar efetivamente o espaço de busca gerando um conjunto de modelos e parâmetros que melhor se ajustam aos dados fornecidos. O exame desta coleção de respostas pode vir a fornecer uma melhor visão sobre o processo permitindo ao pesquisador identificar a aproximação que melhor se adapta às suas necessidades em termos de simplicidade e precisão (VLADISLAVLEVA *et al.*, 2009).

A proposta deste estudo consiste na utilização de regressão simbólica via algoritmo evolutivo (genético) para obter equações analíticas empíricas que sejam capazes de determinar com precisão o fator de efetividade (η_{rs}) para a cinética de Michaelis-Menten, como apresentado na Equação 7 (PEREIRA *et al.*, 2017).

$$\eta_{rs} = f(\phi, \beta) \quad (7)$$

4 | MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 2 apresenta o fluxograma do método utilizado neste estudo, compreendendo os métodos numéricos utilizados para a obtenção dos valores de fator de efetividade pela modelagem fenomenológica (η), que foram alimentados para a realização da regressão simbólica e a obtenção do modelo empírico para a determinação do fator de efetividade (η_{rs}) em função das condições de difusão-reação (β e ϕ).

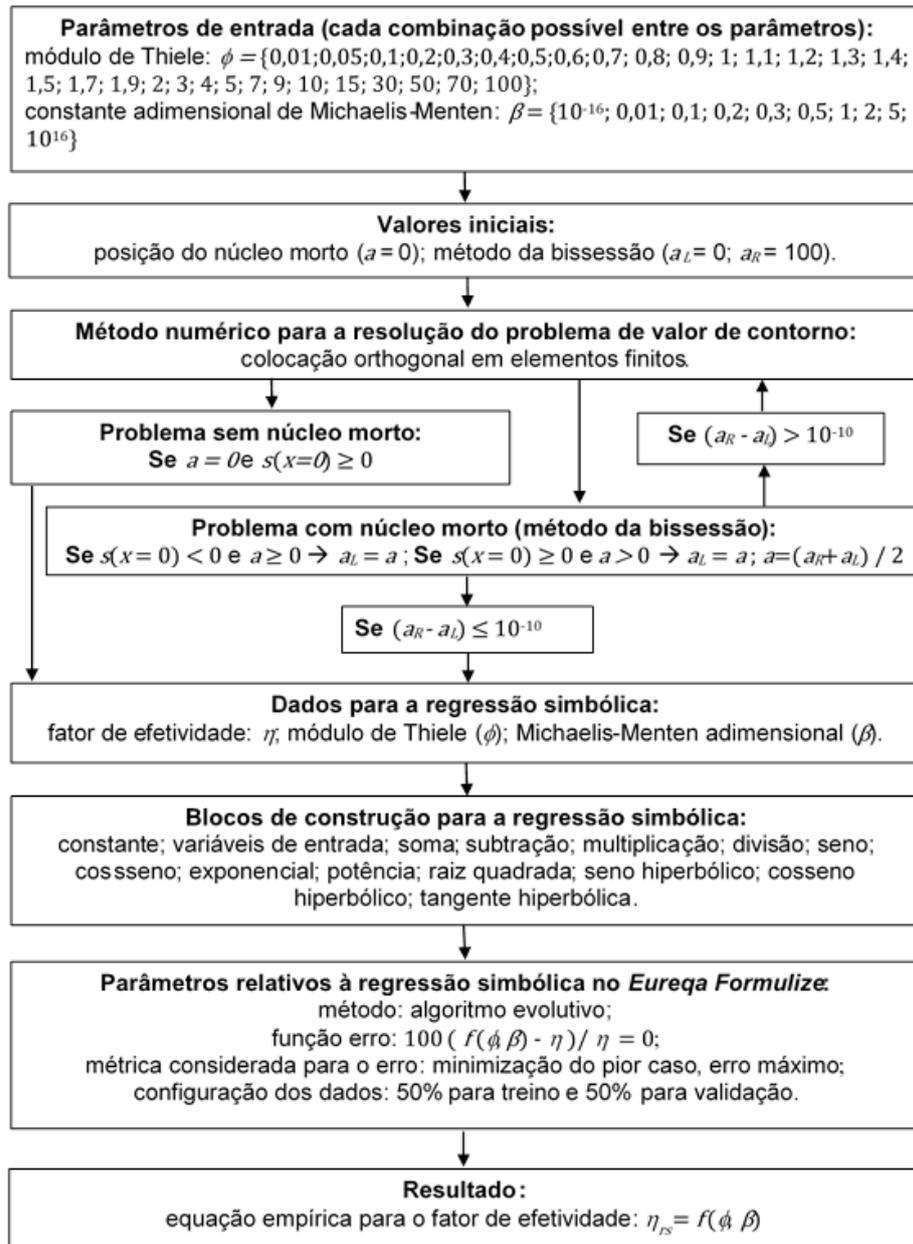


Figura 2 – Fluxograma do método utilizado para a regressão simbólica.

Na resolução do problema de valor no contorno para a obtenção dos dados utilizados na regressão simbólica, descrita no fluxograma da Figura 2, foi utilizado um algoritmo computacional desenvolvido no software *Wolfram Mathematica 11.3* no qual implementou-se o método da colocação ortogonal em elementos finitos.

Considerando todas as possíveis combinações de valores de β e ϕ adotados, foram gerados 310 pontos para a regressão simbólica, a qual foi realizada no software *Nutonian Eureka Formulize*, desenvolvido pela empresa *DataRobot*. A função objetivo utilizada na regressão simbólica foi o valor absoluto máximo do erro ponderado entre os dados alimentados (h , β e ϕ) e os resultados obtidos pelo modelo para a variável dependente, como mostrado na Equação 8 (PEREIRA *et al.*, 2017).

$$erro = \max \left| \frac{\eta - f(\phi, \beta)}{\eta} \right| * 100 \% \quad (8)$$

O procedimento de regressão simbólica foi realizado cerca de 10 vezes durante aproximadamente 10 horas de processamento computacional, sendo considerada como resposta a melhor das soluções obtidas.

5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A equação para a determinação do fator de efetividade para partículas catalíticas esféricas e cinética de reação de Michaelis-Menten obtida via regressão simbólica é apresentada a seguir:

$$\eta = 0.0014 + 0.991 \tanh \left[\frac{\tanh \left[\operatorname{arcsinh} \left[0.0014 + \phi \sqrt{\tanh[\phi]} \right] \right]}{\phi \tanh[\phi] \tanh \left[\beta + 0.93 \tanh \left[0.7 \phi + \sin \left[\sqrt{\beta} \right] - \beta \right] \right]} \right] - 0.0000145 \phi \tanh \left[\beta + 0.93 \tanh \left[0.7 \phi + \sin \left[\sqrt{\beta} \right] - \beta \right] \right] \quad (9)$$

Os valores absolutos do erro máximo e do erro médio foram de 3,5 % e 1,1 %, respectivamente e do coeficiente de determinação ou explicação (R^2) foi de 0,9996. Esses resultados indicam um excelente ajuste da equação proposta aos dados usados na regressão, o que é comprovado pelo gráfico apresentado na Figura 7. Observa-se que as curvas simuladas com o modelo (Equação 9) não possuem ruídos ou distorções, indicando uma boa capacidade preditiva do modelo quanto ao comportamento do fator de efetividade.

O gráfico da distribuição dos erros percentuais está apresentado na Figura 8.

Considerando os baixos valores de erro mostrados na Figura 8 e que os valores máximos de erro se encontram nos limites de valores de ϕ (entre 80 e 100, para os quais $\eta \cong 1/\phi$) e β (acima de 10^{14} , cinética de primeira ordem com solução analítica conhecida), pode-se afirmar que o modelo dado pela Equação 9 descreve satisfatoriamente o comportamento dos dados do fator de efetividade gerados pela abordagem fenomenológica e que foram utilizados na regressão simbólica.

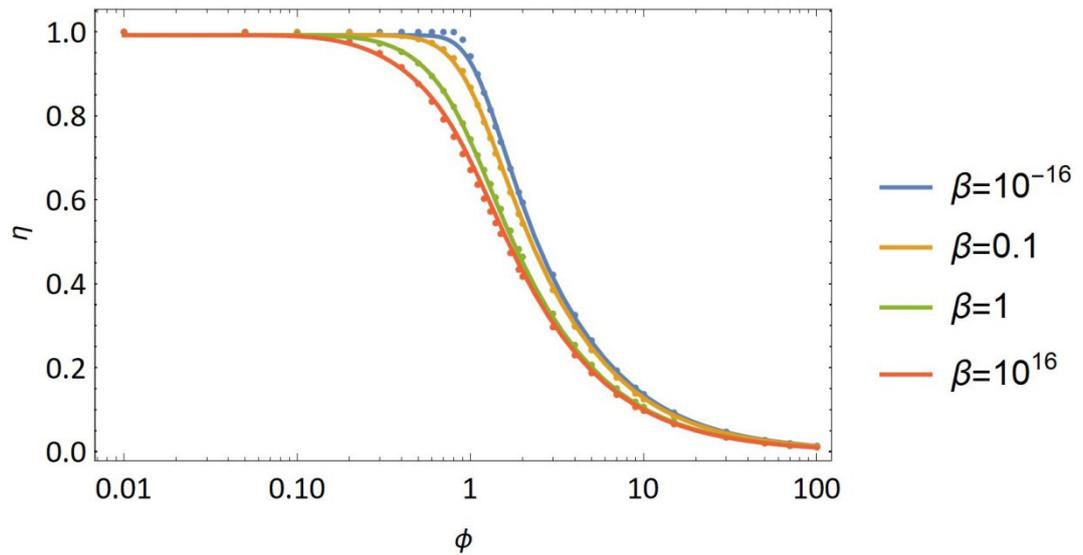


Figura 7 – Gráfico referente ao ajuste do modelo obtido via regressão simbólica

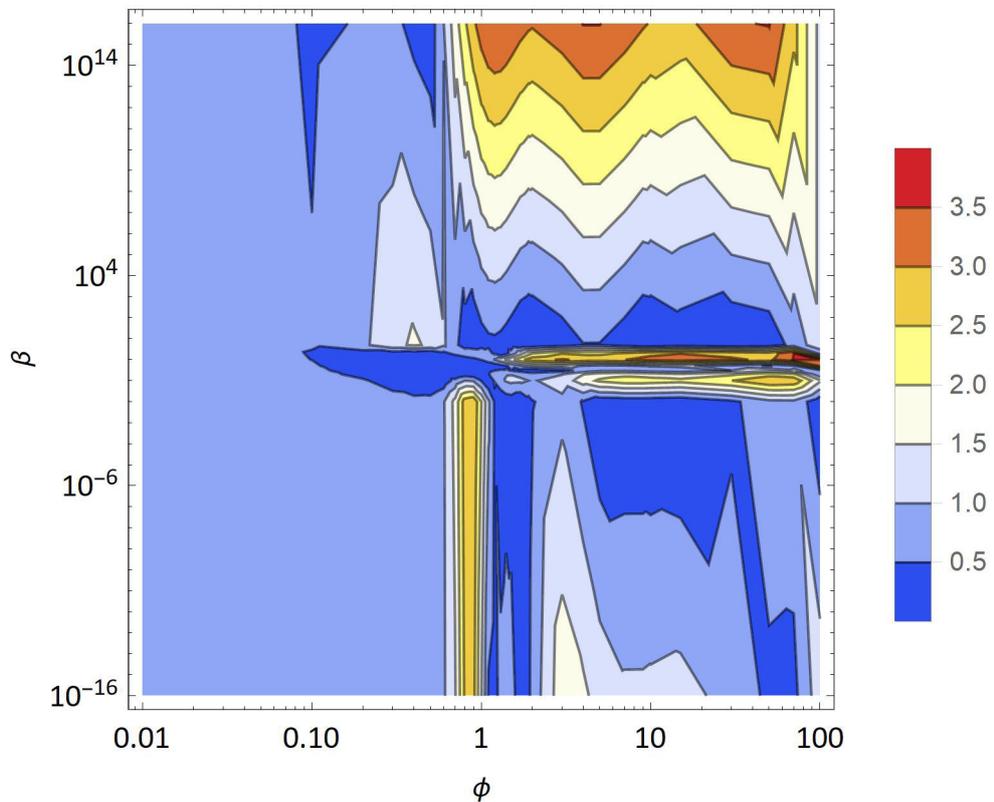


Figura 8 – Gráfico da distribuição dos erros percentuais do modelo na determinação do fator de efetividade para partículas catalíticas esféricas e cinética de Michaelis-Menten

Com base nos resultados obtidos pode-se considerar que o objetivo de obter uma equação explícita aproximada para determinar com precisão o fator de efetividade de partículas catalíticas esféricas foi atingido, haja vista os baixos valores absolutos dos erros percentuais cometidos nas previsões do fator de efetividade utilizando tal equação.

6 | CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que ferramentas de inteligência artificial, como a regressão simbólica podem ser úteis para o desenvolvimento de modelos matemáticos alternativos aos fenomenológicos, uma vez que a resolução de equações diferenciais complexas para a determinação de parâmetros, como o fator de efetividade, pode ser substituída pelo uso de equações empíricas explícitas, que são de resolução mais simples e rápida.

REFERÊNCIAS

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

BARMPALEXIS, P.; KACHRIMANIS, K., TSAKONAS, A., GEORGARAKIS, E.,
Symbolic regression via genetic programming in the optimization of a controlled release pharmaceutical formulation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 107, n. 1, pp. 75-82, 2011.

DEVI, M. R.; SEVUKAPERUMAL, S.; RAJENDRAN, L. **Non-linear reaction diffusion equation with Michaelis–Menten kinetics and Adomian decomposition method**. *Applied Mathematics*, v. 5, n. 1, pp. 21-32, 2015.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, Waltham, 2013.

EDET E.; NTEKPE M.; OMEREJI S. **Current Trend in Enzyme Immobilization: A Review**. *International Journal of Modern Biochemistry*, v. 2, pp. 31-49, 2013.

FARIS, H.; SHETA, A. **A comparison between parametric and non-parametric soft computing approaches to model the temperature of a metal cutting tool**. *International Journal of Computer Integrated Manufacturing*, v. 19, pp. 64-75, 2015.

FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. 4. ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall International, 832 p., 2006.

HAERI, M. A.; EBADZADEH, M. M., FOLINO G., **Statistical genetic programming for symbolic regression**. *Applied Soft Computing*, v. 60, pp. 447-469, 2017.

ILLANES A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Springer Science & Business Media, Netherlands, 390p., 2008.

JOY, R. A.; MEENA, A.; LOGHAMBAL, S.; RAJENDRAN, L. **A two parameter mathematical model for immobilized enzymes and Homotopy analysis method**. *Natural Science*, v. 3, n. 7, pp. 556-565, 2011.

KHALID, M. H.; KAZEMI, P.; PEREZ-GANDARILLAS, L.; MICHRAFY, A.; SZŁĘK, J.; JACHOWICZ, R.; MENDYK, A. **Computational intelligence models to predict porosity of tablets using minimum features**. *Drug Design*, p.193-202, 2017.

LU, Q.; REN, J.; WANG, Z. **Using Genetic Programming with Prior Formula Knowledge to Solve Symbolic Regression Problem**. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2016.

- MAHALAKSHMI, M.; HARIHARAN, G. **An efficient Chebyshev wavelet based analytical algorithm to steady state reaction–diffusion models arising in mathematical chemistry.** *Journal of Mathematical Chemistry*, v. 54, pp. 269-285, 2016.
- OLIVEIRA, R. L.; DIAS, J. L.; SILVA, O. S., PORTO, T. S. **Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 09, pp. 9-18, 2018.
- OLIVEIRA, S. C. **Evaluation of effectiveness factor for immobilized enzymes using Runge-Kutta-Gill method: how to solve mathematical undetermination at particle center point?** *Bioprocess Engineering*, pp. 185-187, 1999.
- PEREIRA, F. M.; LOURES, C. C. A.; AMARAL, M. S.; GOMES, F. M.; PEDRO, G. A.; MACHADO, M. A. G.; REIS C. E. R.; SILVA, M. B. **Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor,** *Fuel*, v. 230, pp. 155-162, 2018.
- PEREIRA F. M.; JUNIOR L. E. G.; GOMES F. M.; SILVA M. B.; OLIVEIRA, S. C. **Evaluation of effectiveness factor of immobilized enzymes using an approach based on artificial intelligence tools.** In. *XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos, XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa.* Anais..., Aracajú, 2017.
- PEREIRA FM; OLIVEIRA SC. **Occurrence of dead core in catalytic particles containing immobilized enzymes: analysis for the Michaelis–Menten kinetics and assessment of numerical methods.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, n. 11, pp. 1717-1727, 2016.
- RAMIREZ, W. F. **Solution of partial differential equations.** In: *Computational methods in process simulation.* Boston: Butherworth Heineman, 2. ed., cap. 10, pp. 389-413, 1998.
- ŠEKULJICA N. Ž.; PRLAINOVIĆ N. Ž.; JOVANOVIĆ J. R.; STEFANOVIĆ A. B.; DJOKIĆ, V. R.; DUŠAN, Ž. M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ Z. D. **Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, n. 3, pp. 461-472, 2016.
- SHANTHI, D.; ANANTHASWAMY, V.; RAJENDRAN, L. **Analysis of non-linear reaction-diffusion processes with Michaelis–Menten kinetics by a new Homotopy perturbation method.** *Natural Science*, 2013, v. 5, pp. 1034-1046.
- VAN ROON, J. L.; ARNTZ M. M. H. D.; KALLENBERG, A. I.; PAASMAN, M. A., TRAMPER J.; SCHROËN, C. G. P. H.; BEEFTINK H.H. **A multicomponent reaction–diffusion model of a heterogeneously distributed immobilized enzyme.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, pp. 263-278, 2006.
- VLADISLAVLEVA, E. J.; SMITS G.F.; HERTOOG, D. **Order of nonlinearity as a complexity measure for models generated by symbolic regression via pareto genetic programming.** *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, v. 13, n. 2, pp. 333-349, 2009.
- WASIK, S; FRATCZAK, F; KRZYSKOW, J; WULNIKOWSKI, J. **Inferring Mathematical Equations Using Crowdsourcing.** *Plos One*, 2015, v. 10, n. 12, p. e0145557, 2015.

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD, BY SPECTROSCOPY IN THE MIDINFRARED, AND MULTIVARIATE CALIBRATION FOR ETHANOL QUANTIFICATION IN THE FERMENTED MANGO PULP (*Mangifera indica* L.) VARIETY BACURI.

Rubens Menezes Gobira

Federal University of Para-UFPA, Network
Bionorte
Belém - Pará

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira

Federal Institute of Amapá - IFAP/Federal
University of Para-UFPA, Network Bionorte
Belém - Pará

Ricardo Felipe Alexandre de Mello

Federal University of Pará, UFPA, Institute of
Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

Graziela Cristiane Telles da Silva

Federal University of Pará - UFPA, Experimental
Physics Laboratory and Computational
Belém - Pará

Sanclayton Geraldo Carneiro Moreira

Federal University of Pará - UFPA, Experimental
Physics Laboratory and Computational
Belém - Pará

Alberdan Silva Santos

Federal University of Pará, UFPA, Institute of
Natural Sciences – ICEN
Belém - Pará

ABSTRACT: The development of reliable analytical methods for the control and monitoring of the quality of the final product is a requirement of the consumer market and inspection and regularization bodies, it is essential for the

industry that they are also convenient from the point of view of technique and cost. Is simple and quick to apply, considerably reducing production stages and losses. The objective of this work was the development of a method for the determination of the ethanol content and other byproducts, such as aldehydes, esters and acids, in a green, fast and cheap way, in distilled fraction of fermented pulp manure using spectroscopy in the region of the medium Infrared and multivariate calibration.

KEYWORDS: Fermentation. Quantification of Ethanol. Infra-red.

1 | INTRODUCTION

The production of alcohol from the fermentation of raw materials rich in carbohydrates is one of the most important routes to obtain alcoholic beverages and alcohol products with high added value (anhydrous alcohol, flavored alcohol, brandy, etc.). Important sector of the alcohol industry. Modern analytical techniques incorporate a number of methodologies, being those based on gas chromatography (GC) the most widely used by industry and regulators in the quality control of these products. However, it is time-consuming and requires pre-treatment of the sample to be able to be applied with good results. Infrared spectroscopy has often been

applied as an analytical method that provides sufficient results in determining the functional aspects of organic molecules and qualitative parameters of agricultural and food products. Recent applications have been made in the oil, textile, coal, cosmetics, polymers, chemistry, paints, pharmaceutical industries, being also applied in the restoration of decorative images of historical paintings. Methods based on MID are environmentally clean because they do not require the use of solvents, they do not generate chemical residues, they may not require any pretreatment of the sample, however, their use must be accompanied by the application of chemometric methods that allow the resolution of selectivity problems Interference without compromising accuracy and accuracy. The development of these methods requires a robust calibration model that incorporates all the possibilities of variation sources, thus improving the quality control of the products. (FERREIRA, BRAGA and SENA, 2013).

2 | METHODOLOGIES

2.1 The collection of the material

The botanical material, mango (*Mangifera indica* L.) variety Bacuri were collected in Bethlehem - PA in the experimental campus EMBRAPA - Eastern Amazon in the X coordinates: 01°14,42S - Y: 48°26'35 "O, Being chosen for sanity and absence of injuries.

2.2 Processing, pulping and characterization of pulp and fermented material

The fruits were baked and sanitized by immersion in 2% (v / v) sodium hypochlorite solution for 15 minutes, rinsed in distilled water. Peels and seeds were removed by hand, the pulp was cut into cubes and ground in a blender, stored in plastic bags of polyethylene (2L) and cooled - 20 C until the analyses and preparation of the must for fermentation were carried out. For characterization, the following analyses were performed: Titratable Total Acidity (ATT) and Total Soluble Solids (TSS) according to IAL (2008); Total Reducing Sugars (TRS) according to MILLER (1959) and Hydrogen Potential-pH AOAC (2007)

2.3 Preparation of pulp mango for the fermentation

A mixture of pulp and water (1:1) had added sucrose until the total soluble solids (TSS) be adjusted to 15 °Brix, and sterilized at 121 °C (1Kgf/cm²) for 15 minutes.

2.4 Fermentation

The fermentation was performed using a semi-closed, static system, in a 5L polypropylene drum equipped with a mechanism to promote the release of CO₂. For the

fermentation process, it was added 9 g/L of dry cells of *Saccharomyces cerevisiae*. The fermentation took place at 30 °C for 15 hours, according to the methodology described in Alvarenga et. al., (2013).

2.5 Distillation

The fermented material was filtered in a cotton tissue and the distillation was processed in a fractional distillation glass column of 1.20 m height. The steam distilled operated at 93 to 98 ° C for 120 minutes.

2.6 Quantification of ethanol by Mid-Infrared Spectroscopy

The concentration of ethanol was determined from the linear relationship between concentration and absorbance (Lambert-Beer Law) of the spectra recorded in the mid-infrared region. For the construction of the analytical curve, standard solutions of ethanol were prepared in the ethanol percent concentrations (V / V) of 10, 50, 90 and 100%. The spectra of standards and samples were recorded on a spectrometer of BRUKER brand, vertex 70v model Fourier transform (FT-IR) and accessory of attenuated total reflectance (ATR) at 23 C °, with 32 scans in the spectral range 4000-400 cm⁻¹ and a resolution of 4 cm⁻¹.

2.7 Treatment of spectral data and quantification of model construction by partial least squares (PLS)

For calculation and construction of multivariate calibration models (PLS) will use the Unscrambler 9.1.7 software. Regarding the pre-processing, the vector normalization and centralization of the data will be tested separately, derived (first and second) to improve the spectral resolution. The adjustment, expressed by the coefficient of determination (R²) along with the number of latent variables (LVs), these two parameters are inverse, although express the model fit, the lower the number of LVs, better and more adjusted is the fashion model; Square root mean squared error (RMSEC), square root mean square error prediction (RMSEP) express the accuracy of the model.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the profile data TSS, TRS, acidity and pH. Analyzing the obtained results, it was verified that at the end of the fermentation there was a decrease in the concentration of TSS and TRS, respectively 77% and 83%, caused by the action of microorganism. It was also found that subtle increase in pH and acidity for the samples, which shows that there was no excess acid production. A high acidity index imparts an

unpleasant taste of vinegar to the product.

	Pulp	Fermented	Distilled
Titrateable Acidity (g / 100 mL)	0.31	0.33	-
Total Soluble Solids (SST) (° Brix)	13	3	-
Total Reducing Sugars (ART) (g / L)	6.58	1.17	-
PH	3.49	3.78	-
Ethanol% (v / v)	-	3,80	91

Table 1. Characterization Table

The fermentation occurred satisfactorily to the point where the yeast can not ferment the available sugars due to lack of nutrients, and the excess of alcohol in the medium. After filtration, 2800 mL of fermented material was obtained and the ethanol obtained in the distillation reached a volume of 106 mL. The Figure 2 illustrates the infrared spectra for the standard ethanol solutions prepared for the construction of the analytical curve and the sample. The prominent bands at 1150 and 1100 cm^{-1} respectively correspond to symmetric and asymmetric stretches of OCC coupling connections in ethanol with absorbance proportional to the concentration. It will be used the wave number selection method of the spectral data in the range of 1120-1000 cm^{-1} to build the mathematical model to quantify partial least squares (PLS). The quality of the constructed models will be evaluated according to the parameters described in section 2.7 and applied in the determination of the alcohol content of the samples.

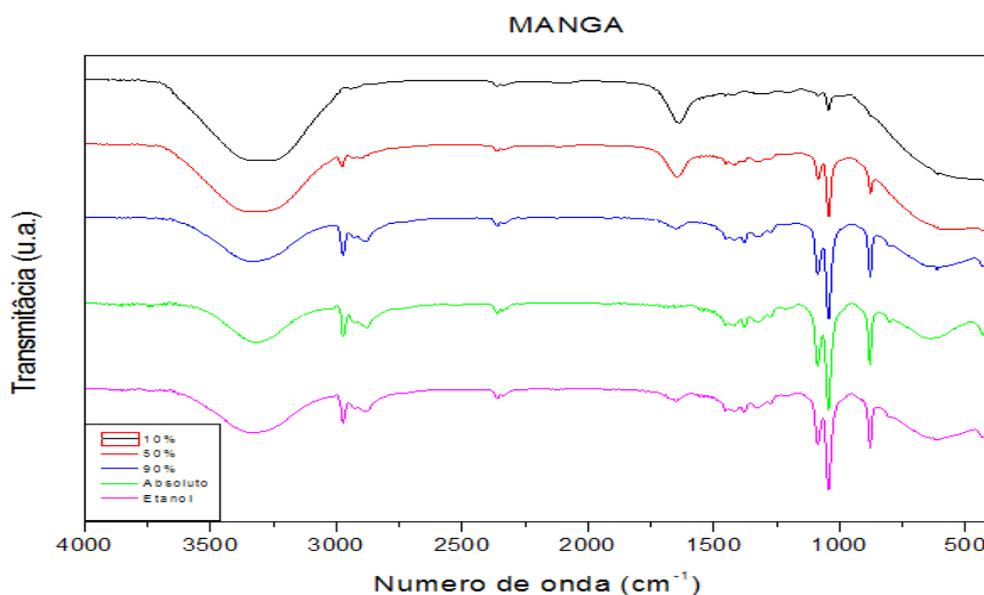


Figura 2: Espectros de infravermelho das soluções padrão e etanol obtido do mosto fermentado da manga por destilação.

4 | CONCLUSIONS

The methodology for obtaining alcohol is fast and satisfactory when applied to the pulp of the mango using commercial yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*), resulting in a final product of high alcohol content. IR spectroscopy proved to be an accurate technique, which was quickly and simply applied to determine the alcohol content of the product obtained by the distillation of fermented mango from the mango. The spectral data recorded for standard solutions and samples will be used in the construction of multivariate quantification models for ethanol and other byproducts produced by the fermentation and that their levels are indicative of quality parameters of the final product. Due to the simplicity of the process, the alcoholic fermentation of the mango is a viable practice for the small producers, aiming to manufacture the mango and consequently to provide a new source of income. The optimization of the manufacturing process is under development to obtain a satisfactory alcoholic degree in order to classify the product as fruit spirits.

REFERENCES

- ALVARENGA, L. M.; ALVARENGA. **Avaliação do fermentado e dos compostos secundários em aguardente de banana e manga**. Alim. Nutrição, Araraquara v. 24, n. 2, 2013, p. 195-201.
- Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2007.
- CARVALHO, C. R.; L. ROSSETO, C. J.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; CASTRO, J. V.; BORTOLETTO, N. **Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo instituto agrônomo de campinas comparadas a outras de importância comercial**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 26, n. 2, 2004, p.264-271.
- FERREIRA, M. H; BRAGA, J. W. B; SENA, M. M. **Development and validation of a chemometric for direct determination of hydrochlorothiazide in a pharmaceutical sample by diffuse reflectance near infrared spectroscopy**. Microchemical Journal. Vol 109, 2013, 158 – 164.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para alimentos**. 4. ed. São Paulo. 2008.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v. 31, n.3, 1959, p. 426-428.
- MUNIZ, C. R.; BORGES, M. F.; ABREU, F. A. P.; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. **Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais**. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 20, n. 2, 2002, p. 309–322.

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO PARA ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anderson dos Santos Barbosa

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial
Aracaju – Sergipe

Danyelle Andrade Mota

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial
Aracaju – Sergipe

Lays Carvalho de Almeida

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

Juliana Lisboa Santana

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

Nayára Bezerra Carvalho

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

Sílvia Regina Soares Martins

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

RESUMO: As enzimas são proteínas que catalisam os processos químicos mais complexos, porém, atuam diferente de alguns catalisadores químicos, sob as condições experimentais brandas. Apesar das excelentes

perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é tão imediata, devido ao seu alto custo e à estabilidade de uma enzima depender de uma série de fatores que limitam sua utilização em escala industrial. Portanto, um dos grandes desafios nas últimas décadas é o uso de conceitos relativos à utilização de diferentes formas nos métodos de imobilização e estabilização da enzima (adsorção, ligação covalente, encapsulação, ligação cruzada, entre outros) procurando aumentar a estabilidade do biocatalisador. Sendo assim, este capítulo trata-se de um referencial teórico a cerca dos principais conceitos e alguns resultados encontrados por diversos autores sobre métodos de imobilização para estabilização de enzimas.

PALAVRAS-CHAVES: Imobilização, estabilização, enzimas.

ABSTRACT: Enzymes are proteins that catalyze more complex chemical processes, but different from some chemical catalysts under the mild experimental conditions. In spite of the excellent perspectives presented by the enzymes as catalysts, their industrial application is not so immediate due to its high cost and the operational stability of an enzyme depend on a series of factors that limit its use on an industrial scale. Therefore, one of the great

challenges in the last decades is the use of concepts related to the use of different forms in the enzyme immobilization methods (adsorption, covalent bonding, encapsulation, crosslinking, among others), in order to increase the stability of the biocatalyst. Thus, this chapter deals with a theoretical reference to the main concepts and some results found by several authors on methods of immobilization for enzyme stabilization.

KEYWORDS: Immobilization, estabilization, enzymes.

1 | INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas capazes de catalisar os processos químicos mais complexos sob condições experimentais brandas. Desta forma, podem ser excelentes catalisadores para a obtenção de produtos químicos muito mais sustentáveis. Do ponto de vista técnico, as enzimas apresentam diversas características que as tornam interessantes para a indústria, tais como: alta especificidade, capacidade de atuação em condições suaves (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e não causam danos ao meio ambiente, sendo por isso consideradas como “catalisadores ecologicamente corretos” (GUISAN, 2006).

A ampliação ou aumento de escala para uma produção catalisada por enzimas em processos industriais nas mais diversas aplicações, algumas vezes se tornam inviáveis, e este fato se deve a alguns fatores que influenciam cada tipo de sistema imobilizado (enzima-suporte) como, por exemplo: o alto custo da maioria das enzimas comerciais, muitas vezes a baixa atividade catalítica, a dificuldade na separação do produto do meio reacional e o principal, baixa estabilidade dentre elas a operacional que visa a reutilização do mesmo biocatalisador em diversas reações (BARBOSA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016; ASMAT *et al.*, 2017). Porém, ainda que atingida a alta eficiência da atividade catalítica das enzimas alguns fatores como o custo limitam a utilização das mesmas em processos de larga escala (ZARCULA *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2015).

Surge então a necessidade de estratégias com a finalidade de diminuir estes obstáculos, como por exemplo, a imobilização de enzimas através de diferentes técnicas e diferentes suportes. E dessa forma conseguir o objetivo de obter a melhora na estabilidade do biocatalisador, separação dos produtos do meio reacional com maior facilidade, além de melhorar a eficiência catalítica da enzima (WANG & HSIEH, 2008; ASGHER *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2017). A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971, que estabelece que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (KENNEDY e CABRAL, 1987).

A imobilização de enzimas é uma técnica cuja finalidade é estabilizar as

biomoléculas através de sua fixação por meios químicos (estabelecido, de no mínimo, uma ligação covalente entre um grupo funcional do suporte e os resíduos terminais de uma enzima, ou entre duas ou mais ligações das moléculas de enzima) e físicos (que não envolve nenhum tipo de ligação química, somente forças físicas) em suportes insolúveis inertes ao meio reacional (ZHAO *et al.*, 2015). Dependendo do pH, temperatura ou adição de reagentes químicos, as enzimas podem ser imobilizadas em alguns polímeros solúveis ou insolúveis, mas normalmente são utilizadas matrizes sólidas e insolúveis como sílica e/ou suportes híbridos (MONDAL *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2011). Assim, enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço e separadas por barreira, que em uma reação permite a interação entre a enzima e o substrato, mas que as tornam, em qualquer meio, pouco solúveis (PAIVA *et al.*, 2000; GIRELLI e MATTEI, 2005).

2 | MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

A escolha criteriosa de uma estratégia de imobilização de enzimas (Figura 1) é baseado na eficácia da utilização da enzima, os custos do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas do biocatalisador imobilizado (KHARRAT *et al.*, 2011). Por esse motivo a avaliação da caracterização físico-química aliada à caracterização bioquímica destes sistemas imobilizados se intensificou na última década. Os biocatalisadores imobilizados em suportes inorgânicos já foram estudados por diversos grupos (BARBOSA *et al.* 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.* 2016), mas poucos relatam a imobilização em suportes orgânicos.

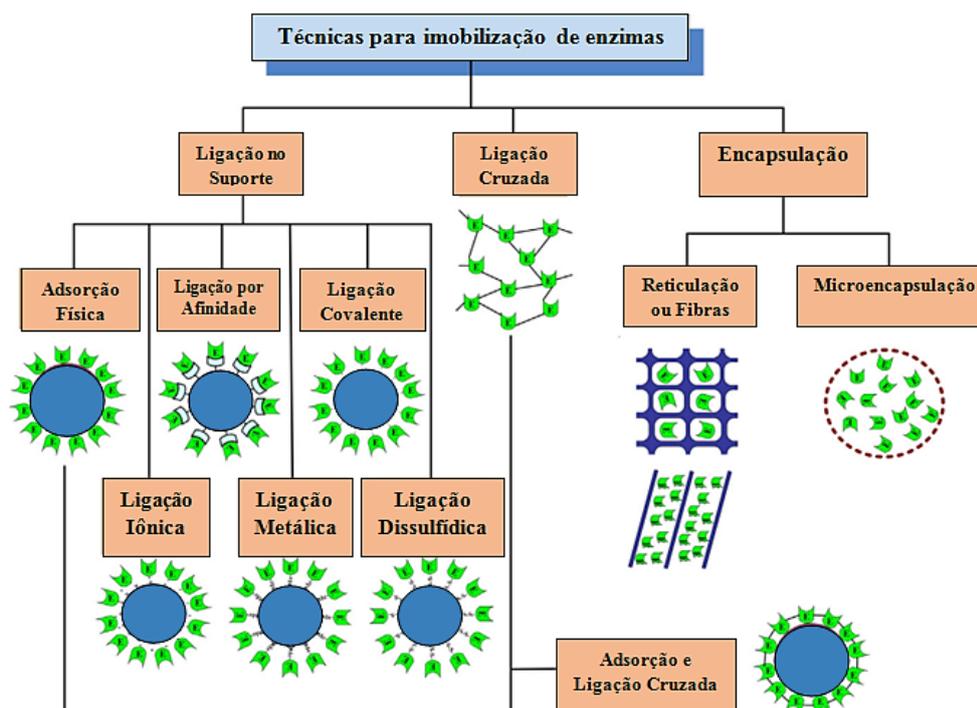


Figura 1 - Diversas técnicas para imobilização de enzimas (Adaptado de ZHAO *et al.*, 2015).

O processo de imobilização envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais dos sistemas, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto (CARVALHO *et al.*, 2015). As lipases, por exemplo, possui um sítio ativo coberto por uma região flexível chamada de tampa ou “*lid*” e a interação com uma superfície hidrofóbica do suporte durante a imobilização desloca a tampa para uma conformação aberta que torna o sítio ativo mais acessível pelo substrato e assim provoca o aumento da atividade catalítica do biocatalisador imobilizado (KALANTARI *et al.*, 2017). Para o uso de resíduos agrícolas ou agroindustriais nos processos de imobilização, tem-se utilizado a imobilização multipontual de lipases, lacases e leveduras conforme descrito na literatura (BRÍGIDA *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2017). E também outros métodos de imobilização como a adsorção física de lacase, β -fructofuranosidase para diversas aplicações (MUSSATO *et al.*, 2009). O uso de uma variedade de métodos de imobilização (adsorção física, ligação covalente, encapsulação e ligação cruzada) em todos os casos, permite o controle de interação entre a enzima e o suporte e aumenta as possibilidades de sucesso, resultando em maior aplicabilidade e economia nos processos industriais.

2.1 Adsorção Física

O método físico para a imobilização de enzimas, a adsorção, é uma das técnicas mais utilizadas na obtenção de biocatalisadores insolúveis por ser considerado um processo simples, menos dispendioso por conseguir manter a atividade catalítica elevada e apresentar um maior potencial comercial para alguns tipos de sistemas imobilizados (KHARRAT *et al.*, 2011). Na adsorção as enzimas são ligadas à matriz através de ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas ou iônicas. A adsorção quando comparada a outros métodos de imobilização oferece algumas vantagens que devem ser consideradas, como: facilidade de no processo de imobilização, a ausência de modificação química e ainda assim o aumento da estabilidade do biocatalisador (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011).

A imobilização nesse método ocorre quando há o contato da enzima com o suporte (Figura 2) nas condições de pH e forças iônicas adequadas (ZHAO *et al.*, 2017). A distância entre as moléculas de enzimas imobilizadas é muito importante e deve ser determinada principalmente pela diferença entre taxa de imobilização e taxa de difusão e pelo carregamento de suporte (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017). Quando relacionado com as outras técnicas, a adsorção pode possuir maior potencial, pois oferece a capacidade de reutilização de suportes, principalmente aqueles de maior valor, pois os tipos de ligações enzima/suporte são reversíveis e assim a enzima imobilizada pode ser removida quando por algum motivo se torna inativa (ARICA e BAYRAMOGLU, 2004).

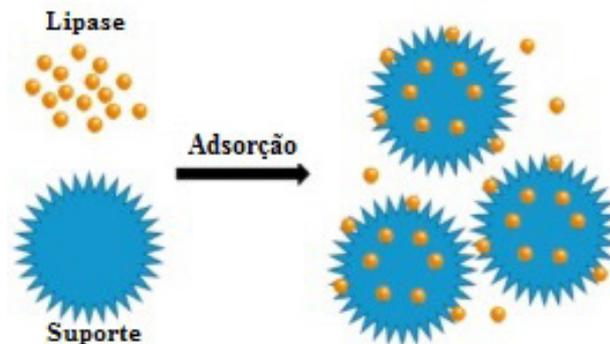


Figura 2 - Imobilização por adsorção física (Adaptado de ZHAO *et al.*, 2017).

Os suportes utilizados nessa técnica podem ser de origem orgânica (lignocelulósicos, DOWEX) ou de origem inorgânica (celite, bentonita, alumina e sílica) ou suportes híbridos (SIMÕES *et al.*, 2011). Imobilizar uma enzima por esse método requer uma interação eletrostática entre a enzima e o suporte, para que a enzima não seja lixiviada até mesmo durante as etapas do processo de imobilização (KHARRAT *et al.*, 2011).

O método baseado na adsorção física da enzima sobre a superfície de suportes insolúveis em água provoca pouca ou nenhuma alteração conformacional da enzima ou destruição de seu sítio ativo (ZIVKOVIC *et al.*, 2015). Porém, como o resultado da força fraca da ligação entre a enzima e o suporte, este método tem uma desvantagem, pois durante o uso repetido há a lixiviação das enzimas adsorvidas do suporte, diminuindo a estabilidade operacional (ZIVKOVIC *et al.*, 2015). Além disso, as enzimas são altamente dependentes das condições do pH, temperatura, substrato e solvente, podendo ser facilmente dessorvidas com qualquer alteração desses parâmetros.

Os suportes porosos utilizados para imobilização de lipase geralmente utilizam a técnica de adsorção física e é uma das maneiras mais empregadas em operações de larga escala através de leito fixo contínuo e reatores de tanque agitado (FORESTI e FERREIRA, 2007; KANG *et al.*, 2007). A imobilização de enzimas em suporte poroso acontece através da incorporação da enzima nos poros de suporte, seguida de sua fixação na parede porosa (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017). Quando uma lipase é adsorvida em um suporte hidrofóbico, sua estrutura é modificada e seu sítio ativo é totalmente exposto (conformação aberta) com o mecanismo de ação, chamado de ativação interfacial, possibilitando uma melhora significativa na catálise (MANOEL *et al.*, 2015). A hiperativação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PF) imobilizada em micropartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos octis, que as tornam mais hidrofóbicas, foi previamente relatada em trabalhos desenvolvidos por KOPP *et al.* (2015).

Em outros trabalhos foram relatados o uso de vários tipos suportes para a imobilização por adsorção física, dentre eles suportes orgânicos: como sabugo de milho para a adsorção de lipase de *Burkholderia cepacia* (RUZENE *et al.*, 2014) e fibra

de coco verde para a imobilização de lacase (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011) e os suportes inorgânicos como: resina macroporosa para imobilização de lipase de *Candida* sp. (99-125 lipase) (GAO *et al.*, 2009), polietileno agarose (TORRES *et al.*, 2006), esferas de polipropileno revestido por vidro (FORESTI E FERREIRA, 2007), entre outros.

2.2 Ligação Covalente

A imobilização por ligação covalente em suportes insolúveis é outro método de imobilização de enzimas muito importante para o melhoramento e estabilização de enzimas, além de permitir uma fácil recuperação e conseqüentemente uma melhor estabilidade operacional (HOU *et al.*, 2015). Dentre os métodos de imobilização a ligação covalente de uma enzima a um suporte é talvez o método mais significativo, porém técnicas e ferramentas de imobilização efetivas exigem uma maior exploração (ASMAT *et al.*, 2017). Nesta técnica a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são estabelecidas entre os grupos primários amino e o anel fenólico de alguns aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte, formando assim o braço espaçador (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Os grupos químicos existentes na enzima interagem através de ligações cruzadas com os grupos químicos do suporte insolúvel, através da modificação da superfície do suporte utilizando agentes multifuncionais (HOMAEI *et al.*, 2013; ATACAN *et al.*, 2017) e muitas vezes envolvem três passos: a ativação do suporte, a modificação da superfície ativada e a imobilização da enzima (IDRIS & BUKHARI, 2012).

A depender da natureza dos grupos ativos do suporte, da reatividade e estado de protonação dos mesmos, pode ocorrer a interação com os grupos da enzima, entre os quais, os que mais se ligam são os grupos químicos –SH, –OH, e –NH₂ (VAIDYA *et al.*, 2008). A enzima imobilizada por esse método, por possuir uma ligação mais forte quando comparada a ligação existente na adsorção, é mais estável, pois sua ligação é irreversível e não se desprende do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica (CASTRO *et al.*, 2008).

Os grupos aminos na superfície das enzimas tratados com agentes que possibilitam a formação de ligação cruzada, tais como glutaraldeído, na presença de um agente precipitante permite uma imobilização devido à preparação de agregados de enzimas por ligação cruzada (CLEAs) que são indicados como biocatalisadores imobilizados eficientes, mesmo em escala industrial (BOROS *et al.*, 2013). O glutaraldeído possui grupos funcionais em uma extremidade da molécula que se ligam a enzima e na outra extremidade grupos que se ligam ao suporte. Por possuir esta estrutura, ele se torna uma das moléculas que podem ser utilizadas como braço espaçador em imobilizações por ligações covalentes (MATEO *et al.*, 2007). Este agente modifica grupos aminos primário das proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos como os tióis, fenóis, imidazólios (BARBOSA *et al.*, 2012).

O revestimento de um suporte com uma mistura dos reagentes sinalizantes como

o 4-aminopeniltrimetoxissilano (APTS) e feniltrimetoxissilano (FTMS) e em diferentes proporções demonstraram que a densidade dos grupos aminados presentes na superfície da sílica pode ser controlada (BANET *et al.*, 2008). Assim, um método simples pode garantir e até mesmo manter a dispersão da funcionalidade dos grupos aminos da superfície (BANET *et al.*, 2008). Outra maneira que pode ajudar na imobilização e estabilização da enzima é a funcionalização do suporte através da adição de grupos aminos para posterior imobilização (Figura 3) (FIROOZ *et al.*, 2017).

Vários aminoácidos da enzima estão relacionados com a elevada força desta ligação, e proporciona uma grande rigidez na estrutura da mesma (BARBOSA *et al.*, 2012). Em processos industriais, o biocatalisador imobilizado por esse método é mais eficiente, pois devido à rigidez da ligação, a estrutura da enzima pode-se manter inalterada diante de qualquer fator que possa desnaturá-la, com a temperatura e pH extremos, solventes orgânicos, e outros (MILETIC *et al.*, 2012). Entretanto, caso a enzima possua diferentes conformações quando ativada e inativada, essa forte ligação pode dificultar a ativação da mesma depois do processo de imobilização, como por exemplo quando imobilizada com o sítio ativo inacessível (MATEO, *et al.*, 2007).

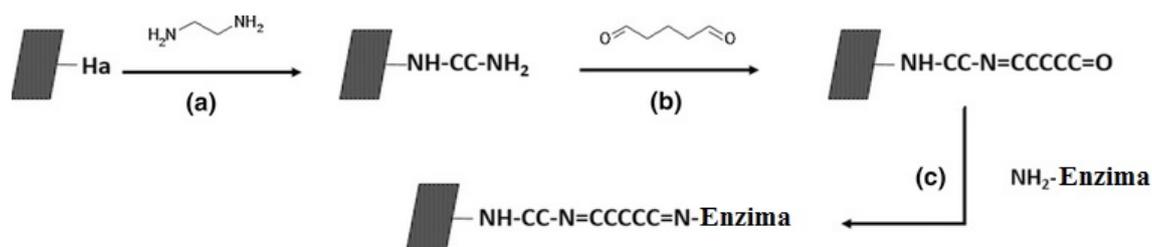


Figura 3 - Mecanismo de imobilização por ligação covalente: (a) funcionalização de celulose com grupos aminos; (b) reticulação com glutaraldeído e (c) imobilização da enzima (FIROOZ *et al.*, 2017).

De acordo com ZHU *et al.* (2011) algumas das vantagens observadas nesse método foi a maior eficiência e estabilidade, já que suas ligações entre o suporte e a enzima não são tão suscetíveis a pH, força iônica, solventes e temperatura. Porém, a ligação covalente pode resultar em perdas da atividade enzimática. As principais razões para que isso ocorra são: mudanças estruturais, que podem ocorrer muitas vezes durante o processo de imobilização; limitações na difusão, reduzindo a conversão e o impedimento estérico, que bloqueia parcialmente a ligação com os sítios ativos.

Durante a última década vários estudos foram realizados com o objetivo de melhorar a atividade da enzima imobilizada através de ligações covalentes. Vishwanath *et al.* (1995) demonstraram que uma imobilização específica e bem ordenada de acordo com os grupos reativos do agente e da enzima, acarretam em um melhor número de sítios ativos disponíveis para a ação catalítica. Em outro estudo a lipase foi imobilizada na presença de aditivos de ácidos graxos, que possibilitou a ocupação do centro ativo por um substrato molecular e impediu uma mudança conformacional da enzima durante o processo de ligação, preservando a alta atividade catalítica

(OZTURK & KILINC, 2010).

Segundo Barbosa et al. (2012) existem duas estratégias para a imobilização por ligação covalente utilizando o glutaraldeído como agente bifuncional, e a primeira é a utilização de um suporte pré-ativado. A ativação ótima (em termos de reatividade) para este suporte acontece quando o aldeído de uma extremidade da molécula se liga ao grupo amino no suporte e o aldeído da outra extremidade fica livre, resultando uma estrutura bastante reativa com os resíduos de aminoácidos da enzima. Esta ativação com glutaraldeído provoca a superfície do suporte um revestimento com um reagente quimicamente reativo, capaz de imobilizar covalentemente proteínas (Figura 4).

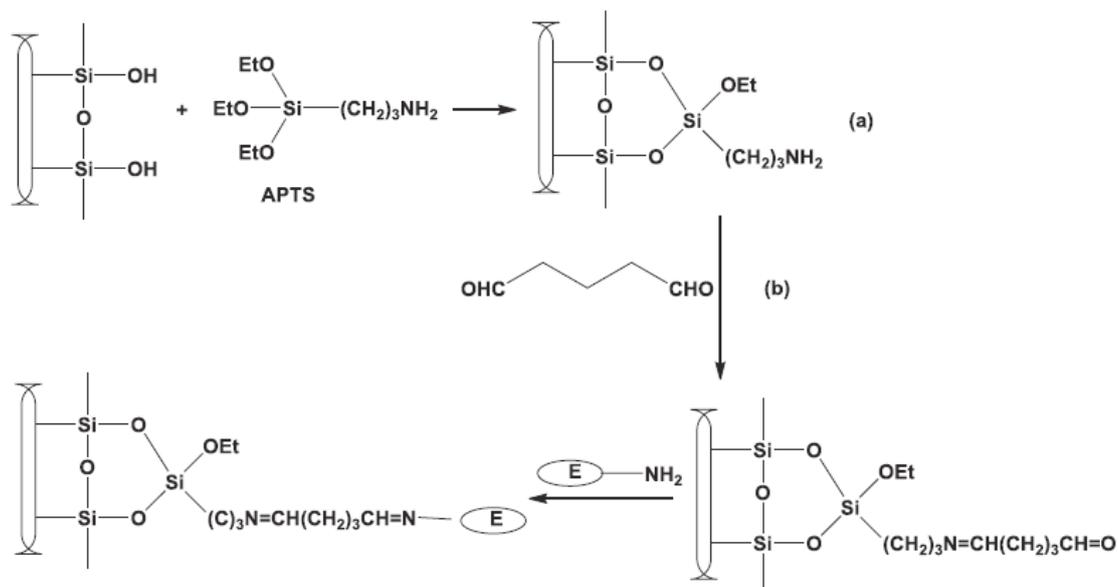


Figura 4 - Mecanismo de imobilização por ligação covalente: (a) silanização e (b) formação do braço espaçador com glutaraldeído (CARDOSO *et al.*, 2009).

A segunda estratégia é para adsorção da enzima por troca iônica sobre o suporte aminado e, posteriormente, tratar este composto com glutaraldeído sob condições suaves para obtenção da ligação entre a enzima e o suporte através da ativação de todos os grupos amino primários do suporte e da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído (Figura 5) (RODRIGUES *et al.*, 2011).

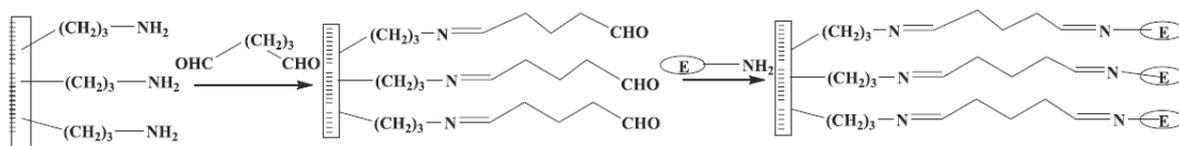


Figura 5 - Reação de suportes aminopropilados para ligação covalente utilizando o glutaraldeído como agente de ativação (CARDOSO *et al.*, 2009).

A imobilização covalente pode ocorrer também através de ligações multipontuais envolvendo muitos locais na superfície da enzima ligados ao suporte (Figura 6). Segundo POPPE *et al.* (2013), as enzimas só se tornam estávelmente imobilizadas no suporte, quando, pelo menos, duas ligações são produzidas no complexo enzima-

suporte. Porém quando a imobilização é realizada a pH 7 (neutro), o único grupo amino reativo na superfície da enzima é o amino terminal, uma vez que outros grupos aminos são ionizados e não reagem com o suporte. Portanto, para que as enzimas fiquem imobilizados multipontualmente nestes suportes essa imobilização precisa ocorrer apenas em valores de pH próximos ou acima de 10, pois em pH altos o ϵ -amino dos resíduos de lisina presente na superfície da lipase estão suficientemente reativos, favorecendo a ligação multipontual (MATEO *et al.*, 2005).

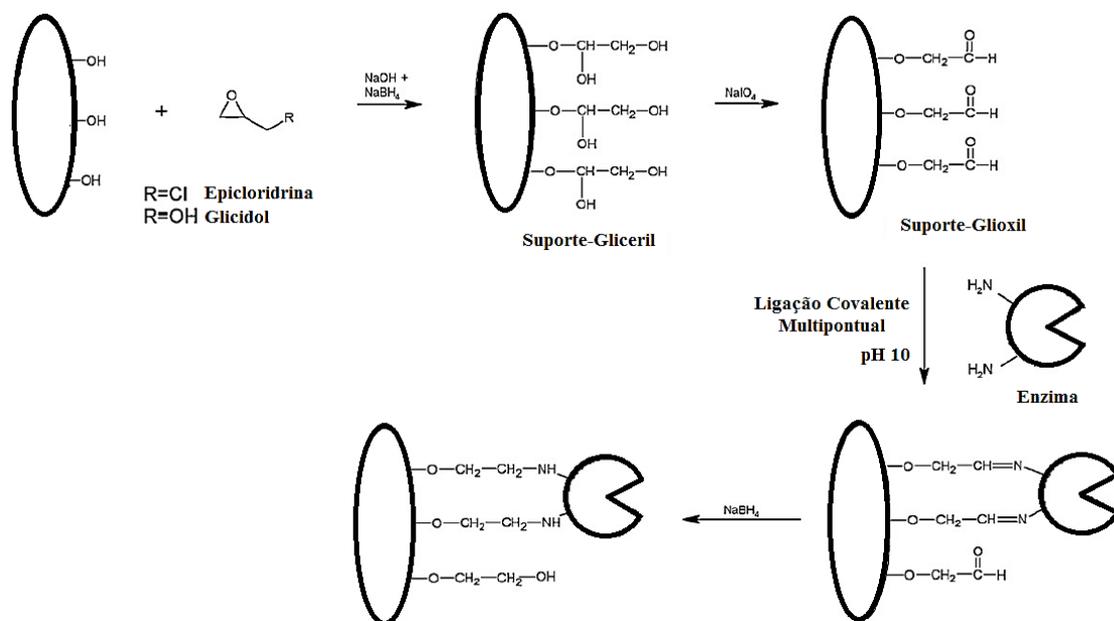


Figura 6 - Mecanismo de ligação covalente multipontual em suportes funcionalizados com glicidol (Adaptado de MENDES *et al.*, 2011a).

Os suportes utilizados para imobilização por ligação covalente multipontual devem apresentar algumas características importantes, como uma grande superfície para que dessa forma tenha uma boa congruência geométrica com a superfície da enzima (MATEO *et al.*, 2006). Em alguns casos, a ligação covalente multipontual permite uma elevada intensidade na ligação entre enzima e suporte, como enzima-amino-glutaraldeído ou suporte-amino-glutaraldeído e assim tornando-a susceptível em reações com amplos valores de pH (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Segundo MATEO *et al.* (2007), a ligação multipontual de enzimas em suportes pré-existente ativada com grupos aldeído por meio de pequenos braços espaçadores promove uma estrutura mais rígida da enzima imobilizada, quando comparada a ligação unipontual. Porém, em alguns casos esta modificação da superfície da enzima pode também ter um impacto (negativo ou positivo) em sua estabilidade e atividade enzimática, pois todos os grupos amino de superfície enzima são modificados (BARBOSA *et al.*, 2012).

A redução das alterações conformacionais envolvidos na inativação da enzima e conseqüentemente no aumento da estabilidade da enzima imobilizada está também relacionado com a distância relativa entre todos os aminoácidos da enzima envolvidos na imobilização e o suporte, que deve ser muito pequena. Desse modo, um maior

número possível de resíduos de aminoácidos da enzima reage com o suporte causando uma ligação mais forte entre ambos (MATEO *et al.*, 2007).

Trabalhos veem sendo desenvolvidos com a imobilização por ligação covalente multipontual em diversos tipos de suporte e com diferentes agentes funcionalizantes. Em sua maioria, o biocatalisador imobilizado obteve uma maior estabilidade térmica, como lipases de *Rhizomucor miehei* (LRM) e *Candida antarctica* (CALB) imobilizadas em resina ativada com aldeído (POPPE *et al.*, 2013) e a lipase de *Rhizopus oryzae* (LRO) imobilizada em sílica funcionalizada com grupo epóxi (ASHJARI *et al.*, 2015). Outro estudo, a lipase de *Hypocrea pseudokoningii* foi imobilizada em suportes de glioxil-agarose e também apresentou uma melhor estabilidade térmica e à solventes orgânicos (PEREIRA *et al.*, 2015).

2.3 Encapsulação

As novas técnicas de imobilização são utilizadas para conservar a natureza catalítica do biocatalisador, dentre elas, o método de encapsulação pela técnica sol-gel mostrou ser uma técnica versátil para a imobilização de uma grande variedade de biomoléculas (SOARES *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2014). O encapsulamento atraiu uma considerável atenção em áreas como biotecnologia, medicina, farmacêutica, catálise, nutrição e ecologia (KATO *et al.*, 2011).

O método consiste na proteção às biomoléculas através da sua imobilização no interior de uma rede polimérica ou microcápsulas de polímeros que representa um microambiente separado do ambiente externo e permite o substrato e os produtos passarem através dos mesmos, mas com retenção da enzima (ZHANG *et al.*, 2012). Depois do aprisionamento, as enzimas não estão ligadas à matriz polimérica ou cápsula, e sua difusão é limitada, porém quando comparado com lipases imobilizadas por adsorção física, os imobilizados por encapsulação apresentaram uma maior estabilidade (ZHAO *et al.*, 2015). Pode limitar os movimentos de desdobramentos e rotações da enzima, por outro lado, permite o reconhecimento do substrato, favorecendo uma boa catálise (GUISAN, 2006). Um estudo realizado por Barbosa *et al.* (2014) mostrou que a lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em aerogel de sílica apresentou eficiência catalítica significativa na reação de hidrólise de azeite de oliva e manteve estável, acima de 50% da atividade inicial relativa, durante 23 reusos do mesmo biocatalisador em reações consecutivas.

Dentre os métodos de imobilização de enzimas, devido a simples preparação, a vasta diversidade de biomoléculas e sua reprodutibilidade, por não necessitar de equipamentos sofisticados, a encapsulação é considerada uma boa alternativa. Segundo Guisan (2006) este processo é baseado no confinamento da enzima em uma matriz física, e pode envolver a polimerização de materiais orgânicos ao redor da mesma, cujo envoltório é constituído por um polímero geliforme e permeável, não havendo, portanto, a associação covalente entre a rede e as biomoléculas.

O método de encapsulação chama atenção para a formação de diversas estruturas como estudos realizados recentemente envolvendo materiais inorgânicos e orgânicos (MAJEWSKI *et al.*, 2017). Majewski *et al.* (2017) envolve duas estratégias gerais de confinamento (Figura 7): na primeira ocorre a síntese do suporte a partir da combinação dos materiais orgânicos e inorgânicos da estrutura juntamente com a enzima, em condições que favorecem a formação da estrutura do suporte e preservam a estrutura terciária da enzima ativa. Na segunda a enzima é introduzida em um suporte pré-existente que apresenta canais e/ou aberturas (celas) maiores do que o tamanho da enzima e assim, e posteriormente esse material juntamente com a enzima já introduzida é revestida com outro material.

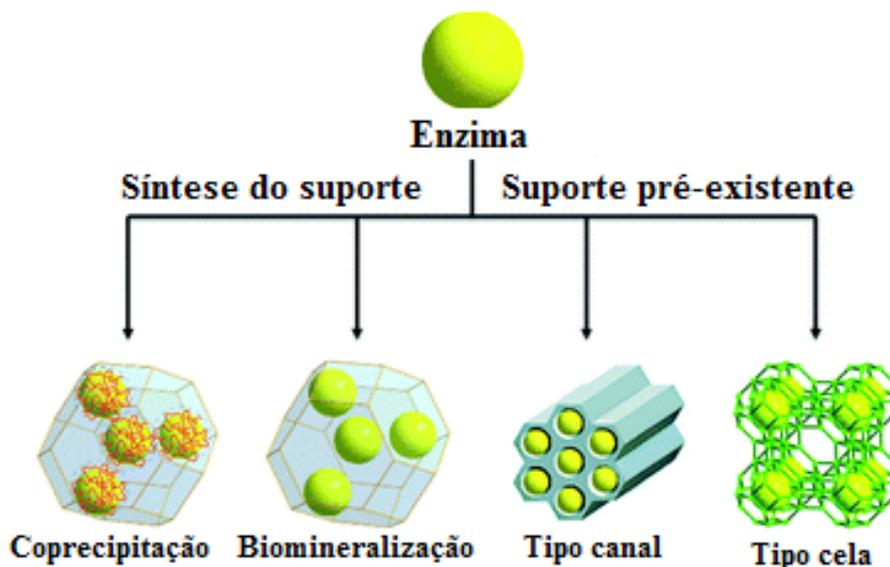


Figura 7 - Métodos de encapsulação enzimática (MAJEWSKI *et al.*, 2017).

A encapsulação oferece várias vantagens, dentre elas a possibilidade de modificação da matriz quimicamente; permeabilidade das matrizes, que permite adaptação de biomoléculas de tamanhos variáveis, transporte de composto com baixo peso molecular sem desprendimento das biomoléculas imobilizadas; propriedades ópticas, que possibilitam a medição de sinais de fluorescência e absorbância; além de resistências a agentes térmicos, químicos e degradação biológica (GUISAN, 2006). As condições a serem usadas para preparar a estrutura de suporte implica a preservação da atividade, eficiência e estabilidade da enzima (MAJEWSKI *et al.*, 2017).

Para melhorar a atuação de enzimas em meio orgânico tem-se utilizado o procedimento de encapsulação em meio poroso durante a síntese pela técnica sol-gel, onde a enzima é encapsulada quando é adicionada ao meio reacional ainda no processo de formação do gel. O processo sol-gel é baseado na capacidade de formação de sílica, óxido metálico e matrizes organosiloxano, onde sua porosidade é definida pela reação de precursores orgânicos em temperatura ambiente (GUISAN, 2006). Além disso, para melhorar ainda mais é relatado na literatura o uso de aditivos no processo de imobilização pela técnica sol-gel como agentes que influenciam positivamente o aumento da atividade e da estabilidade de enzimas imobilizadas (HARA *et al.*, 2010;

BARBOSA *et al.*, 2014;2016). Essa influência está diretamente associada à proteção da enzima contra a inativação durante a etapa de encapsulamento, à retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e aos efeitos dispersantes das moléculas da enzima (LEVANDOSKI *et al.*, 2015).

As técnicas de encapsulação são instrumentos confiáveis e chamam atenção por oferecer diversas aplicações, tais como biossensores, bioelétrica, bioprocessos, biocatalisadores, cromatografia de bioafinidade e biotransdutores. No entanto, o método de encapsulação em sistemas preparados para aplicações catalíticas, também tem como considerações importantes o efeito que a estrutura escolhida pode ter em fatores como a difusão e/ou a seletividade do substrato (MAJEWSKI *et al.*, 2017), já que uma das desvantagens encontradas é a dificuldade de difusão dos substratos por entre os poros da matriz do suporte. Ainda que todas essas vantagens e resultados promissores sejam alcançados se faz necessária à busca de protocolos e precursores mais biocompatíveis, com a finalidade de minimizar efeitos de retração e colapso dos poros e assim melhorar ainda mais a eficiência catalítica, e a estabilidade mecânica do sol-gel (GUISAN, 2006).

A técnica tem aplicações industriais com base em métodos químicos e físicos, tais como a evaporação do solvente, polimerização interfacial, e da armadilha (orgânico/inorgânico) da matriz (KATO *et al.*, 2011). Atualmente, dispõe-se de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (RUZENE *et al.*, 2014, BARBOSA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016; MAJEWSKI *et al.*, 2017).

2.4 Ligação Cruzada

A ligação cruzada é um método de imobilização responsável pela síntese de CLEA's (Cross-Linked Enzyme Aggregates) que são agregados de enzimas reticuladas. CLEA's é uma técnica de imobilização relativamente recente desenvolvida originalmente há pouco mais de 40 anos atrás pelo grupo de estudos do Prof. Jorge Sheldon (SHELDON, 2007; SHELDON, 2011). A preparação do CLEA apresenta algumas vantagens e por isso vem chamando atenção de vários pesquisadores, pois é considerada um procedimento simples, pois a proteína não precisa ser purificada e requer somente a precipitação da mesma para a formação de agregados (MAHMOD *et al.* 2016). Segundo Sheldon (2011) o melhor agente reticulante para a formação dos agregados é o glutaraldeído.

O processo de imobilização ocorre quando o glutaraldeído penetra na estrutura interna da enzima e seu grupo aldeído reage com os grupos amino da proteína que provoca uma agregação química entre as enzimas formando um "biocatalisador sólido", podendo eventualmente acontecer reações com outros grupos como os tióis, fenóis e imidazólios (YUSOF *et al.*, 2016). Alguns fatores são importantes para controlar o tamanho final das partículas de CLEA, são eles: o tipo e quantidade do precipitado,

a velocidade de agitação, concentração de proteínas, além da concentração de glutaraldeído (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Algumas enzimas possuem uma pequena quantidade de grupos aminas, que pode prejudicar a reticulação tornando a imobilização pouco eficaz, já que a mesma acontece entre o grupo aldeído e amino do agente e enzima, respectivamente. Para amenizar ou sanar esse problema surge a necessidade de adicionar mais uma etapa no processo de imobilização por CLEA, o uso de aditivos (Figura 7). A utilização de aditivos como outras proteínas, por exemplo, a albumina bovina, é comumente observada em alguns trabalhos por possuir um grande número de grupos amino que facilitam o intercruzamento (DONG *et al.*, 2010).

A adição de diferentes aditivos, além de facilitar a formação do CLEA, aumenta a atividade enzimática, estabilidade, e pode ser separado facilmente por filtração e centrifugação (YUSOF *et al.*, 2016). Em contrapartida, para algumas aplicações industriais a utilização de CLEA's não são viáveis, pois não são mecanicamente resistentes por serem frágeis e a depender da viscosidade do precipitante utilizado sua recuperação torna-se difícil e complexa para utilização em larga escala (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

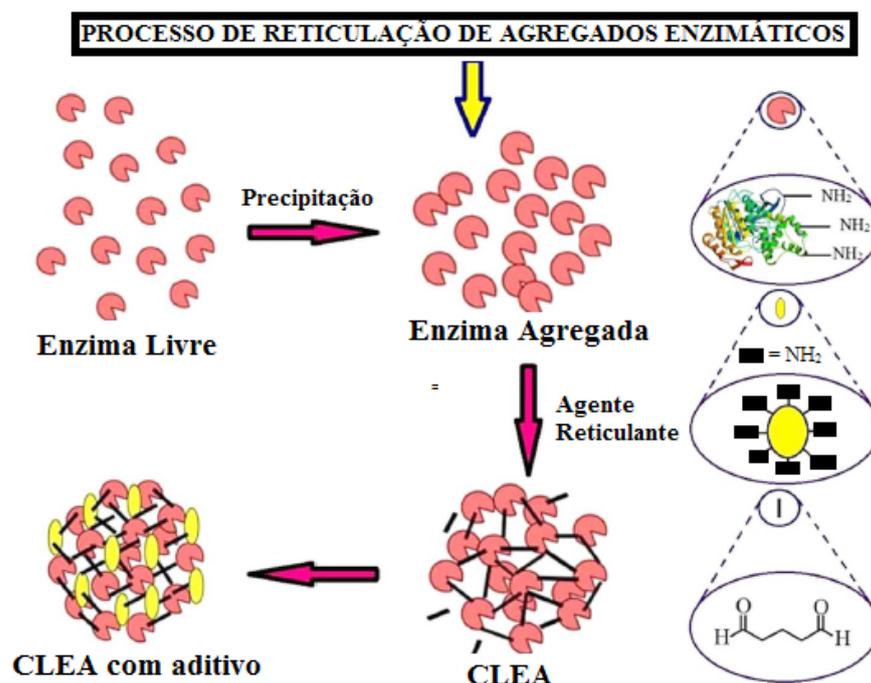


Figura 7 - Esquema da preparação de CLEA's utilizando aditivo (Adaptado de YUSOF *et al.*, 2016).

Portanto, com o objetivo de aprimoramento de biocatalisadores mais eficientes, imobilizados em diferentes suportes, o uso de matrizes de natureza orgânica, inorgânica ou híbrido têm apresentado particular interesse comercial nos últimos anos, devido às suas diferentes características e aplicações.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. C.; BARBOSA, A. S.; FRICKS, A. T.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization.** *Process Biochemistry* 61: 124-129, 2017.
- ARICA M.Y.; BAYRAMOGLU, G. **Polyethyleneimine-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible glucose oxidase immobilization.** *Biochemistry Engineering Journal* 20: 73–7, 2004.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. **Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101: 56– 66, 2014.
- ASHJARI, K.; MOHAMMADIC, M.; BADRI, R. **Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115: 128–134, 2015.
- ASMAT, S.; HUSAIN, O.; AZAM, A. **Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: stability and activity insights.** *RSC Advances* 7: 5019–5029, 2017.
- ATACAN, K.; ÇAKIROGLU, B.; ÖZACAR, M. **Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetitenanoparticles and its application for casein digestion.** *International Journal of Biological Macromolecules* 97: 148–155, 2017.
- BANET, P.; MARCOTTE, N.; LERNER, D. A.; BRUNEL, D. **Single-step dispersion of functionalities on a silica surface.** *Langmuir* 24(16): 9030–9037, 2008.
- BARBOSA, A. S.; LISBOA, J. A.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; PEREIRA, M. M.; FRICKS, A. T.; MATTEDI, S.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. **The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization.** *Química Nova* 39 (4): 415-422, 2016.
- BARBOSA, A. S.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. **Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel.** *Química Nova* 37 (6): 969-976, 2014.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDES-LAFUENTE, R. **Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*.** *Process Biochemistry* 47: 1220–1227, 2012.
- BOROS, Z.; WIESER, D.; MARKUS, M.; ABAHAZIOVA, E.; MAGYAR, A.; TOMIN, A.; KOCZKA, B.; KOCZKA, P.; POPPE, L. **Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations.** *Process Biochemistry* 48: 1039–1047, 2013.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber.** *Appl Biochem Biotechnology* 146: 173–187, 2008.
- BRITO, M. J. P.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, F. C. I.; SANTOS, L. S.; MONTEIRO, K. A. **Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization.** *Fuel Processing Technology* 156: 421–428, 2017.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases.** *Química Nova* 38: 399-409, 2015.

CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. **ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA: Produção, Aplicações e Mercado**. Capítulo 6 – Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: Editores: Elba P.S. Bon (IQ/UFRJ), Maria Antonieta Ferrara (FIOCRUZ) e Maria Luisa Corvo (INETI - Lisboa, Portugal) Alane B. Vermelho (UFRJ), Carmem Lucia A. Paiva (UNIRIO), Ricardo Bicca de Alencastro (IUFRRJ) e Rosalie R. R. Coelho (UFRJ). (Org.). Rio de Janeiro: EDITORA INTERCIÊNCIA, 2008.

CRISTÓVÃO, A. R. O.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I. S.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. A. **Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72: 6 – 12, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Synthetic applications of lipases immobilized on polymers**. *Química Nova* 27 (4): 623-630, 2004.

DONG, T.; ZHAO, L.; HUANG, Y.; TAN, X. **Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive**. *Bioresour Technol* 101: 6569–6571, 2010.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Effect of protein load on stability of immobilized enzymes**. *Enzyme and Microbial Technology* 98: 18–25, 2017.

FIROOZ, N. S.; PANAH, R.; MOKHTARANI, B.; YAZDANI, F. **Direct introduction of amine groups into cellulosic paper for covalent immobilization of tyrosinase: support characterization and enzyme properties**. *Cellulose* 24: 1407–1416, 2017.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. **Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 294: 147 – 155, 2007.

GAO, S.; WANG, Y.; WANG, T.; LUO, G.; DAI, Y. **Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption**. *Bioresour Technol* 100: 996 - 999, 2009.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. **Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance**. *Adv Synth Catal* 353: 2885–2904, 2011.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. **Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review**. *Journal of Chromatography B* 819: 3-16, 2005.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed., Institute of Catalysis, CSIC Campus UAM–Cantoblanco- Madrid, Spain, 2006.

HARA, P.; MIKKOLA, J. P.; MURZIN, D. Y.; KANERVA, L. T. **Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67: 129-134, 2010.

HOMAEI, A.A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. **Enzyme immobilization: an update**. *J. Chem. Biol.* 6: 185–205, 2013.

HOU, C.; QI, Z.; ZHU, H. **Preparation of Core-shell Magnetic Polydopamine/Alginate Biocomposite for *Candida rugosa* lipase Immobilization**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128: 544-551, 2015.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. **Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and**

application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnol. Adv.* 30 (3): 550–563, 2012.

KALANTARI, M.; YU, M.; YANG, Y.; STROUNINA, E.; GU, Z.; HUANG, X.; ZHANG, J.; SONG, H.; YU, C. **Tailoring mesoporous-silica nanoparticles for robust immobilization of lipase and biocatalysis.** *Nano Research* 10 (2): 605–617, 2017.

KANG, Y.; HE, J.; GUO, X.; GUO, X.; SONG, Z. **Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15.** *Industry and Engineering Chemistry Research* 46: 4474–4479, 2007.

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. **Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids.** *Journal of the Ceramic Society of Japan.* 119 (2): 140-143, 2011.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. **Enzyme Technology.** In: *Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 vol.* Edited by H.J.REHM and G.REED: v.7 Editor John F. Kennedy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft., pp. 347- 404, 1987.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.-TALEL; CHAABOUNI, M. **Immobilization of *Rhizopus oryzae* Lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with free enzyme.** *Process Biochemistry* 46: 1083 - 1089, 2011.

KOPP, W.; SILVA, F. A.; LIMA, L. N.; MASUNAGA, S. H.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. **Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications.** *Mater. Sci. Eng. B* 193: 217–228, 2015.

LEVANDOSKI; K. L. D.; FICANHA; A. M M.; ANTUNES, A.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI M. L. **Imobilização da lipase cal b em xerogel obtido pela técnica sol-gel Utilizando líquido iônico como aditivo.** *Perspectiva, Erechim.* 39 (147): 51-60, 2015.

MAHMOD, S. S.; YUSOF, F.; JAMI, M. S.; KHANAHMADI, S. **Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease.** *Bioresour. Bioprocess.* 3: 3, 2016.

MAJEWSKI, M. B.; HOWARTH, A. J.; Li, P.; WASIELEWSKI, M. R.; HUPPAB, J T.; FARHA, O. K. **Enzyme encapsulation in metal-organic frameworks for applications in catalysis.** *The Royal Society of Chemistry: CrystEngComm*, 2017.

MANOEL, E. A.; JOSÉ, C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme.** *Enzyme and Microbial Technology* 71: 53–57, 2015.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** *Enzyme and Microbial Techonology* 40: 1451-1463, 2007.

MENDES, A.A.; DE CASTRO, H.F.; GIORDANO. R.L.C.. **Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*.** *Química Nova* 36: 245-251, 2013.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. **Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications.** *Bioresource Technology* 115: 126–135, 2012.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; MEHTA, B. R.; VARANDANI, D.; GUPTA, M. N. **A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764: 1080-1086, 2006.

- MUSSATO, S.I.; AGUILAR, C.N.; RODRIGUES, L.R. TEXEIRA, J.A. **Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59: 76–81, 2009.
- OLIVEIRA, M. V. S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. **Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive.** *Acta Scientiarum. Technology* 36 (3): 445-451, 2014.
- OZTURK, T. K.; KILINC, A. **Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67: 214–218, 2010.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X.; **Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases.** *Enzyme and Microbial Technology* 27:187-204, 2000.
- PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D. A.; POLIZELI, A. M.; VIVI, A. C.; JORGE, J. A.; PESSELA, B. C.; FÉRNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. **Stabilization of the lipase of *Hypocrea pseudokoningii* by multipoint covalent immobilization after chemical modification and application of the biocatalyst in oil hydrolysis.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 121: 82–89, 2015.
- POPPE, J. K.; COSTA, A. P. O.; BRASIL, M. C.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. **Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 94: 57– 62, 2013.
- RODRIGUES, J.; PERRIER, V.; LECOMTE, J.; DUBREUCQ, E.; FERREIRA-DIAS, S. **Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous médium.** *Bioresource Technology* 218: 1224–1229, 2016.
- RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes.** *Adv Synth Catal*: 353: 2216–2238, 2011.
- RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COSTA, D. M.; CABRERA-PADILLA, R.Y.; CASTRO, R. S. S.; SOUZA, E. R.; TEIXEIRA, J. A. C.; QUEISSADA, D. D. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140013156, data de depósito: 20/01/2014, título: “**UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**”, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2014.
- SHELDON, R. A. **Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs).** *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 467–477, 2011.
- SHELDON, R. A. **Enzyme immobilization: the quest for optimum performance.** *Adv Synth Catal* 349: 1289–1307, 2007.
- SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. **Desempenho da Matriz Híbrida SiO₂-Quitossana na Imobilização da Lipase Microbiana de *Candida rugosa*.** *Química Nova* 34: 33-38, 2011.
- SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 39: 69–76, 2006.
- TORRES R.; ORTIZ C.; PESSELA B.C.C.; PALOMO J.M.; MATEO C.; GUISAN JM.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions.** *Enzyme and Microbial Technology* 39: 167–71, 2006.

- VAIDYA, B. K.; INGAVLE, G. C.; PONRATHNAM, S.; KULKARNI, B.D.; NENE, S. N. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles.** *Bioresource Technology* 99: 3623-3629, 2008.
- VISHWANATH, S.; BHATTACHARYYA, D.; HUANG, W.; BACHAS, L. G. **Site-Directed and Random Enzyme Immobilization on Functionalized Membranes: Kinetic Studies and Models.** *Journal of Membrane Science*. 108: 1-13, 1995.
- WANG, Y.; HSIEH, Y.L. **Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes.** *Journal Membrane Science* 309: 73 - 81, 2008.
- YUSOF, F.; KHANAHMADI, S.; AMID, A.; MAHMOD, S. S. **Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate.** *SpringerPlus* 5: 57, 2016.
- ZARCULA, C.; CROITORU, R.; CORÎCI, L.; CSUNDERLIK, C.; PETER, F. **Improvement of Lipase Catalytic Properties by Immobilization in Hybrid Matrices.** *World Academy of Science, Engineering and Technology* 52: 179 - 184, 2009.
- ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. **Enzyme immobilization for biodiesel production.** *Appl Microbiol Biotechnol* 93:61–70, 2012.
- ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, H.; DENG, L.; LIU, J.; WANG, F.; TAN, T. **Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase.** *Renewable Energy* 103: 383-387, 2017.
- ZHAO, X.; OI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. **Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44:182–197, 2015.
- ZHU, X.; ZHOU, T.; WU, X.; CAI, Y.; YAO, D.; XIE, C.; LIU, D. **Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media.** *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* 72: 145 – 149, 2011.
- ZIVKOVIC, L. T. I.; ZIVKOVIC, L. S.; BABIC, B. M.; KOKUNESOSKI, M. J.; JOKIC, B. M.; KARADZIC, I. M. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia.** *Biochemical Engineering Journal* 93: 73–83, 2015.

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS E DA CORDO EXTRATO DE *Eugênia involucrata* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE AGENTES CONSERVANTES NA TEMPERATURA DE 90°C

Lauren Menegon de Oliveira

Instituto Superior de Ensino de Sinop (ISES)

Sinop – Mato Grosso

Francine Antelo

Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Rio Grande – Rio Grande do Sul

RESUMO: A cor é um importante atributo na aparência, processamento e aceitabilidade de alimentos. As antocianinas, pigmentos naturais pertencentes à família dos flavonoides, presentes amplamente na natureza, destacam-se como potenciais fontes de corantes para a indústria, sobretudo alimentícia. Diante disso esse trabalho teve como objetivo caracterizar a cinética do processo termodegradativo a 90°C da concentração e da cor das antocianinas de *E. involucrata*, na ausência e na presença de esteviosídeo, sacarose, frutose e ácido cítrico como agentes conservantes. A cinética de degradação da concentração das antocianinas seguiu um modelo de primeira ordem, assim como para os parâmetros de cor C^* e TCD, enquanto que o parâmetro da cor h° seguiu um modelo de cinética de ordem zero. A adição de 15 g.L⁻¹ de esteviosídeo na temperatura estudada aumentou a meia-vida do extrato, reduzindo, dessa forma, o processo degradativo, ou seja, reduzindo o valor de k_d .

PALAVRAS-CHAVE: Corantes alimentícios,

esteviosídeo, sacarose, frutose, coroma.

ABSTRACT: Color is an important attribute in the appearance, processing and acceptability of food. Anthocyanins, natural pigments belonging to the family of flavonoids, widely present in nature, stand out as potential sources of dyes for the industry, especially of food. The objective of this work was to characterize the kinetics of the thermodegradation process at 90 °C of the concentration and color of the anthocyanins of *E. involucrata*, in the absence and presence of stevioside, sucrose, fructose and citric acid as preservatives. The degradation kinetics of the concentration of anthocyanins followed a first order model, as well as for the color parameters C^* and TCD, while the color parameter h° followed a zero order kinetic model. The addition of 15 g.L⁻¹ of stevioside at the temperature studied increased the half-life of the extract, thus reducing the degradation process, that is, reducing the value of k_d .

KEY WORDS: Food colorings, stevioside, sucrose, fructose, coroma.

1 | INTRODUÇÃO

Inúmeros produtos alimentícios originalmente não apresentam cor ou ela pode ser perdida ou alterada durante o

processamento, surgindo então à necessidade da adição de corantes com a finalidade de conferir ou restaurar a coloração (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2006).

A coloração é a primeira qualidade sensorial pelo qual os alimentos são julgados e, portanto, amplamente utilizada na indústria alimentícia para atender as expectativas dos consumidores, que usualmente associam cor ao sabor, cheiro ou qualidade do produto. Por essa razão, o setor alimentício preocupa-se tanto com a aplicação de cores (através do uso de corantes) e obtenção de alimentos que agradem aos olhos do consumidor, pois além de necessária para sobrevivência, a alimentação também é fonte de prazer e satisfação (CONSTANT, STRINGHETA, SANDI, 2002).

As antocianinas são compostos da família dos flavonoides e constituem o grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982). Sua estabilidade química é o foco principal de muitos estudos, devido ao grande potencial de aplicação, aos seus efeitos benéficos e ao seu uso como alternativa aos corantes artificiais nos alimentos (OTT, 1992).

Prevenir a degradação de antocianinas é um aspecto muito importante que pode beneficiar os dois lados, consumidores e processadores. Dessa forma deve haver uma busca por minimizar as perdas de pigmentos durante o processamento, garantindo assim a qualidade do produto final. É difícil prever a perda de antocianinas individuais durante o processo de aquecimento, então para se poder ter uma maior compreensão da degradação térmica das antocianinas e prever as mudanças de qualidade que ocorrem durante o tratamento térmico é necessário investigar a cinética de degradação da sua concentração e da cor (KARA & ERÇELEBI, 2013).

Segundo Wrolstad et al. (1990), a concentração elevada de açúcar estabiliza as antocianinas e este efeito pode ser explicado pelo fato de que a adição de açúcar, mesmo que em pequenas concentrações, reduz a atividade de água, e esse fato pode ter impacto sobre a estabilidade do pigmento.

Aliados a estudos de avaliação da degradação térmica de antocianinas é importante avaliar a degradação da cor. A vantagem de usar os parâmetros de cor visual é que eles podem ser medidos instantaneamente usando colorímetros e indicados como controle de qualidade instantâneo durante o processamento térmico da indústria de alimentos (YANG *et. al.*, 2008).

As coordenadas mais comuns L^* a^* b^* não expressam a cor de forma direta e são difíceis de interpretar de forma independente, assim, C^* e h° e TCD podem preferencialmente ser utilizados como índices de qualidade dos produtos alimentícios (MINOLTA, 1993).

Dessa forma, esse trabalho buscou caracterizar a cinética do processo termodegradativo a 90°C da concentração e da cor das antocianinas de *E. involucrata*, na ausência e na presença de agentes conservantes.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração das antocianinas

As cerejeiras-do-mato foram coletadas na cidade de Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil, foram acondicionadas em potes de plástico e congeladas à temperatura média de -11 °C no Laboratório de Cinética e Termodinâmica dos Processos Degradativos (LCTPD - FURG) e as antocianinas foram extraídas conforme Oliveira (2017).

2.2 Determinação da cinética de degradação das antocianinas

Amostras de 5 mL do extrato puro e adicionado dos agentes conservantes nas suas respectivas concentrações, foram mantidas em tubos de ensaio com tampa de rosca e foram submetidas à 90°C e retiradas periodicamente até que atingissem a metade da concentração inicial. O monitoramento da degradação dos extratos foi feito através de leitura espectrofotométrica a 535 nm e calculados segundo Fuleki & Francis (1968), conforme a Equação (1):

$$C_A = \left(\frac{Abs_{535} \times PM_{cian-3,5-glicosídeo} \times FD}{\epsilon} \right) * 100 \quad (1)$$

onde C_A é a concentração de antocianinas totais expressas em mg de cianidina-3,5-glicosídeo.100g de amostra⁻¹, Abs_{535} é a absorvância do extrato lida à 535 nm, $PM_{cian-3,5-glicosídeo}$ é a massa molar da cianidina-3,5-glicosídeo igual a 664,5 g.mol⁻¹, FD é o fator de diluição e ϵ é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3,5-glicosídeo em solução de etanol acidificada à 535 nm, cujo valor é 1,25x10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹. Os agentes conservantes utilizados e suas respectivas concentrações foram: esteviosídeo, 0,75 e 15%, sacarose, 20 e 40%, frutose, 20 e 40% e ácido cítrico, 25 e 50% (em concentrações massa:volume). Todas as análises foram realizadas em triplicata. O extrato teve seu pH corrigido para 3 com HCl 0,1 M, valor que garante maior estabilidade às antocianinas. O monitoramento da cor foi realizado por análise colorimétrica (colorímetro CR 400 Minolta), determinando-se os parâmetros L, a* e b* para cada amostra.

2.3 Parâmetros da cor

O valor do Cromo (C^*) e do ângulo Hue (h°) foram calculados através das Equações 2 e 3 e a diferença total de cor (TDC) através da Equação 4 (MINOLTA, 1993):

$$C^* = \frac{(a^*)^2 + (b^*)^2}{2} \quad (2)$$

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (3)$$

$$TCD = \sqrt{(L^*_0 - L^*)^2 + (a^*_0 - a^*)^2 + (b^*_0 - b^*)^2} \quad (4)$$

onde L^*_0 , a^*_0 e b^*_0 são as leituras iniciais da cor, sem tratamento térmico e L^* , a^* e b^* são as leituras da cor em determinado tempo e temperatura.

2.4 Constante cinética de degradação

A constante de degradação térmica para a concentração foi definida através da regressão dos dados experimentais da concentração inicial com o tempo, como descreveu Fogler (2012), para um modelo de cinética de primeira ordem (Equação 5).

$$\ln \frac{C_{A_0}}{C_A} = k_d \times t \quad (5)$$

onde C_{A_0} e C_A são as concentrações de antocianinas inicial e em um determinado tempo em mg de cianidina-3,5-glicosídeo.100g de amostra⁻¹, t é o tempo em h e k_d é a constante cinética de degradação em h⁻¹. A Equação 5 foi utilizada para a determinação da k_d dos parâmetros C^* e TDC. O modelo de ordem zero foi utilizado para a determinação do k_d em relação ao parâmetro h° , de acordo com a Equação 6, segundo Fogler (2009).

$$\text{Parâmetro de cor} = k_d \cdot t \quad (6)$$

2.5 Meia vida

A meia-vida ($t_{1/2}$) do extrato é dada pela Equação 7 (FOGLER, 2006):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (7)$$

onde k_d é a constante cinética de degradação em h⁻¹.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das constantes cinéticas de degradação térmica (k_d) e da meia-vida ($t_{1/2}$) em relação à concentração estão apresentados na Tabela 1 assim como os coeficientes de determinação (R^2), que confirmam o modelo cinético de primeira ordem. Estes dados estão de acordo com Wang e Xu (2007) e Harbourne *et al.* (2008), que relataram que a cinética de primeira ordem é o modelo mais adequado para ser utilizado em extratos de frutas.

AMOSTRA	k_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²
Controle	0,180 ± 0,000 ^a	3,854	0,90
Esteviosídeo 0,75%	0,180 ± 0,000 ^a	3,854	0,90
Esteviosídeo 1,5%	0,160 ± 7,07E ^{-08 f}	4,336	0,90
Sacarose 20%	0,180 ± 0,000 ^a	3,854	0,95
Sacarose 40%	0,324 ± 0,000 ^b	2,141	0,97
Frutose 20%	0,216 ± 0,000 ^e	3,212	0,94
Frutose 40%	0,252 ± 0,000 ^d	2,753	0,95
Ác. Cítrico 25%	0,720 ± 0,000 ^c	0,963	0,98
Ác. Cítrico 50%	0,360 ± 0,000 ^b	1,927	0,98

Tabela 1 - Valores das constantes cinéticas de degradação térmica (k_d) e meia-vida ($t_{1/2}$) para cada condição de extrato proposta quando submetidos a temperatura de 90°C.

*Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias em cada coluna, com $p < 0,05$.

Os extratos adicionados de 20% de sacarose e 0,75% de esteviosídeo não reduziram a degradação do extrato visto que as constantes cinéticas obtidas não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao valor obtido para o extrato branco, apresentando para estas condições uma meia-vida igual a 3,85 h. Contudo, a adição de 1,5% de esteviosídeo ao extrato foi a única condição que promoveu um aumento na meia-vida da concentração do extrato, correspondendo a um ganho de 11,11% em relação à obtida para o branco. Consequentemente, foi o ensaio que a menor constante cinética de degradação (k_d).

Os valores de k_d relacionados com os parâmetros colorimétricos estão apresentados na Tabela 2, assim como os coeficientes de determinação (R²), que confirmam que os parâmetros da cor C* e TCD, seguiram um modelo de cinética de primeira ordem enquanto que o parâmetro de cor h° seguiu um modelo de ordem zero. Kara e Erçelebi (2013) e Yang *et al.* (2008) observaram essa mesma dinâmica em seus estudos de degradação das antocianinas extraídas de *Morus nigra* L. e *Zea mays* L., nessa ordem.

	C* (1° ordem)			h° (ordem zero)			TCD (1° ordem)		
	k_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²	k_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²	k_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²
Controle	0,208 ^a	3,337	0,91	0,117 ^a	5,919	0,91	0,117 ^a	5,914	0,92
Esteviosídeo 0,75%	0,196 ^a	3,540	0,90	0,121 ^a	5,752	0,95	0,112 ^a	6,178	0,90
Esteviosídeo 1,5%	0,222 ^a	3,117	0,91	0,136 ^a	5,093	0,96	0,098 ^a	7,087	0,90
Sacarose 20%	0,229 ^a	3,028	0,90	0,142 ^a	4,892	0,93	0,111 ^a	6,267	0,92
Sacarose 40%	0,181 ^a	3,836	0,92	0,147 ^a	4,712	0,93	0,113 ^a	6,134	0,91
Frutose 20%	0,162 ^a	4,289	0,91	0,178 ^a	3,898	0,92	0,120 ^a	5,762	0,91
Frutose 40%	0,210 ^a	3,302	0,90	0,169 ^a	4,115	0,78	0,100 ^a	6,945	0,90
Ác. Cítrico 25%	0,328 ^b	2,116	0,93	0,231 ^c	2,999	0,94	0,613 ^b	1,131	0,90
Ác. Cítrico 50%	0,341 ^b	2,034	0,92	0,334 ^c	2,078	0,92	0,834 ^c	0,831	0,91

Tabela 2 - Valores das constantes cinéticas de degradação térmica (k_d) para os parâmetros C*, h° e TCD e meia-vida ($t_{1/2}$) para cada condição de extrato proposta quando submetidos a temperatura de 90°C.

*Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias em cada coluna, com $p < 0,05$.

O Croma (C^*) caracteriza a saturação e é definido pela distância de h° ao centro do diagrama tridimensional, sendo que o valor igual zero fica localizado no centro e vai aumentando de acordo com a distância que está do raio. Já o parâmetro h° caracteriza a tonalidade e demonstra a localização da cor no diagrama da cor (MINOLTA, 1993) onde o ângulo 0° representa vermelho puro; o 90° , o amarelo puro; o 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. Segundo Kara e Erçelebi (2013), a percepção da cor é resultado das mudanças em a^* , b^* e L^* , cuja interpretação independente apresenta certa dificuldade. Dessa forma, o uso do TCD (Diferença Total de Cor) pode ser mais adequado para a predição do processo degradativo das antocianinas.

A partir dos dados obtidos é possível observar que as constantes cinéticas de degradação para os parâmetros C^* , h° e TCD obtidas quando adicionado ao extrato algum dos agentes conservantes, não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao valor obtido para o extrato controle, com exceção da incorporação do ácido cítrico. A adição desse ácido pode induzir a degradação da antocianinas devido à redução do pH, ocasionando uma rápida hidratação do cátion flavílium, resultando na formação do carbinol que é incolor (PATRAS *et al.*, 2010).

4 | CONCLUSÃO

A degradação da concentração das antocianinas de cerejeira-do-mato assim como do Croma (saturação da cor) e da Diferença Total de Cor seguiu um modelo de cinética de primeira ordem enquanto que o processo degradativo do ângulo Hue (tonalidade da cor) seguiu um modelo de ordem zero. A análise dos parâmetros cinéticos para cada condição proposta demonstrou que a 90°C a adição de 15 g/L de esteviosídeo foi promissora na minimização da termodegradação da concentração do flavonóide enquanto que as incorporações não alteraram o processo degradativo da cor.

REFERÊNCIAS

CONSTANT, P. B. L., STRINGHETA, P. C., SANDI, D., 2002. **Corantes alimentícios**. Boletim do CEPPA, 20, 203-220.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

FULEKI, T., FRANCIS, F. J., 1968. **Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries**. Journal of Food Science. 33, 72-77.

HARBOURNE, N., JACQUIER, J. C., MORGAN, D. J., LYNG, J. G., 2008. **Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods**. Food Chemistry. 111, 204-208.

KARA, S., ERÇELEBI, E. A., 2013. **Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.)**. Journal of Food Engineering. 116, 541-547.

MARKAKIS, P. **Stability of anthocyanins in foods. In: Anthocyanins in color foods.** New York: Ed. Academic Press, 1982.

MINOLTA, 1993. **Precise Color Communication – Color control, from feeling to instrumentaion.** Minolta Camera Co.,Ltd., Osaka-Japan.

OLIVEIRA, L. M., 2017. **Determinação das melhores condições de extração e caracterização cinética e termodinâmica do processo degradativo de antocianinas de *Eugenia involucrata* (Cerejeira-do-mato).** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

OTT, D. B. **Manual de laboratório de ciência de los alimentos.** Zaragoza: Ed. Acribia S. A., 1992.

PATRAS, A., BRUNTON, N. P., O'DONNELL, C., TIWARI, B. K., 2010. **Effect of termal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation.** Trends of Food Science and Technology. 21, 3-11.

VIDOTTI, E. C., ROLLEMBERG, M. C. E., 2006. **Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos.** Química Nova. 29, 230-233.

WANG, W. D., XU S. Y., 2007. **Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate.** Journal of Food Engineering. 82, 271-275.

WROLSTAD, R.;SPANOS, G. A.; HEATHERBELL, D. A., 1990. **Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38, 1572-1579

YANG Z., HAN Y., GU Z., FAN G., CHEN Z., 2008. **Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zeamays L.*).** Innovative Food Science and Emerging Technologies. 9, 341-347. =

BIOTRATAMENTO DE VINHAÇA SINTÉTICA E GERAÇÃO DE ELETRICIDADE UTILIZANDO UMA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA

Cristiane Angélica Ottoni

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral
Paulista – UNESP
São Vicente – São Paulo

Marta Filipa Simões

Departamento de Biologia, Edge Hill University
Ormskirk, United Kingdom

Jonas Gomes dos Santos

Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de
São Paulo, BIONANO
São Paulo-São Paulo

Luciana Peixoto

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do
Minho
Braga-Portugal

Rodrigo Fernando Brambilla de Souza

Departamento de Química, Universidade Federal
do Amazonas
Manaus-Amazonas

Almir Oliveira Neto

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares,
IPEN/CNEN
São Paulo-São Paulo

António Guerreiro de Brito

Departamento de Ciências e Engenharia de
Biosistemas, Universidade de Lisboa
Lisboa-Portugal

Alfredo Eduardo Maiorano

Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de
São Paulo, BIONANO
São Paulo-São Paulo

RESUMO: O Brasil é um dos maiores produtores de etanol no mundo, no entanto, durante o processo de obtenção deste combustível, elevadas quantidades de vinhaça são geradas, em média, para cada litro de etanol produzido são gerados 13 litros deste resíduo. A vinhaça possui propriedades físicas e químicas que podem desencadear efeitos nocivos à biota, deste modo, existe um interesse crescente em identificar novas tecnologias para o seu tratamento. A utilização de células a combustível microbianas (CCMs) apresenta um enorme potencial, uma vez que, pode promover simultaneamente o tratamento deste resíduo e a biogeração de energia elétrica, pela conversão da energia química disponível nesses substratos biodegradáveis diretamente em eletricidade, por meio da ação catalítica de bactérias eletrogênicas aderidas ao eletrodo. Neste contexto, o presente estudo avaliou a utilização de uma CCM de câmara dupla no tratamento de vinhaça sintética. Durante a operação deste reator foi detectada uma máxima densidade de potência de $330 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ e uma redução na demanda química de oxigênio (DQO) em 58,8% após 28 dias. Diante destes resultados preliminares, a tecnologia CCM pode ser considerada promissora no tratamento da vinhaça, contudo, estudos a respeito da configuração, tipo de inóculo e formas de operação da CCM são necessários

para que amplie sua eficiência.

PALAVRAS-CHAVE: Vinhaça sintética, Célula Combustível Microbiana, Bactéria Redutora de sulfato, Demanda Química de oxigênio, Densidade de potência.

ABSTRACT: Brazil is one of the largest producers of ethanol in the world, however, during the process of obtaining ethanol, high quantities of vinasse are generated, on average, for each liter of ethanol produced, 13 liters of this residue is generated. Vinasse has physical and chemical properties that can trigger harmful effects on biota, so there is a growing interest in identifying new technologies for its treatment. The use of microbial fuel cells (CCMs) presents a very high potential, since it can simultaneously promote the treatment of this residue and the biogenesis of electric energy, by converting the available chemical energy in these biodegradable substrates and directly into electricity, by means of the action of electrogenic bacteria adhered to the electrode. In this context, the present study evaluated the use of a double chamber CCM in the treatment of synthetic vinasse. During the operation of this reactor, a maximum power density of 330 mW m⁻² and a reduction in chemical oxygen demand (COD) was detected at 58.8% after 28 days. Considering these preliminary results, CCM technology may be considered promising in the treatment of vinasse, however, studies regarding the configuration, type of inoculum and forms of CCM operation are necessary to increase its efficiency.

KEYWORDS: Synthetic vinasse, Microbial Fuel Cell, Sulfate-reducing bacteria, chemical oxygen demand, power density.

1 | INTRODUÇÃO

O aumento das necessidades energéticas mundiais, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis definem um novo panorama para o século XXI e determinam que novas políticas referentes a fontes de energia sejam adotadas. O alarmante crescimento da procura por fontes de energia, associado à incerteza quanto à disponibilidade e ao preço do petróleo conduzem à adoção de práticas para o desenvolvimento e exploração de novos recursos energéticos para a manutenção do crescimento sustentável da sociedade (SÁ *et al.*, 2014; HASSAN *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2012). Dentre os biocombustíveis obtidos de matérias-primas renováveis, o etanol da cana-de-açúcar pode dar uma contribuição substancial em termos de quantidade produzida e impacto ambiental (MORAES *et al.*, 2014; HARDE *et al.*, 2014).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Segundo dados do Anuário Brasileiro da Cana-de-açúcar (2012), na safra 2012/2013, estima-se que tenham sido produzidos 596,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 8,5 milhões de hectares (2,1 % a mais do que o ciclo anterior) o que representa uma produtividade média de 70 toneladas por hectare. (MORIMOTO; RIZK, 2014; MARTÍNEZ *et al.*, 2013). No ano

de 2012, foi produzido um total de 23,5 bilhões de litros de etanol. Contudo, muito embora o etanol seja um recurso renovável, por cada litro produzido são gerados, aproximadamente, 13 L de vinhaça. Considerando esses números, cerca de 305,5 bilhões de litros de vinhaça foram gerados em 2012 (LAZARO *et al.*, 2014).

A vinhaça é um resíduo da produção do etanol que apresenta um baixo valor de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅), uma alta Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH baixo e é rica em substâncias orgânicas e minerais, com predominância do potássio (Tabela 1). Esta complexa composição pode causar alterações nas propriedades físicas e químicas dos solos que recebem descargas frequentes deste resíduo, resultando em efeitos nocivos à agricultura e à biota em geral (SANTOS *et al.*, 2014; SYDNEY *et al.*, 2014; POTENTINI *et al.*, 2006).

A carga orgânica da vinhaça provoca a proliferação de microrganismos que consomem o oxigênio dissolvido na água, desencadeando assim, a destruição da fauna e flora aquática e reduzindo também a possibilidade do consumo da água dos locais contaminados. Além disso, o descarte de vinhaça nos cursos de água contribui para o agravamento de doenças endêmicas, como a malária, amebíase e esquistossomose, além do odor desagradável (LAIME *et al.*, 2011). A vinhaça pode ser também uma fonte significativa de emissão de gases do efeito estufa na atmosfera, devido à decomposição aeróbia e anaeróbica da matéria orgânica que ocorre durante o transporte, armazenamento temporário ou até mesmo descarte deste resíduo (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Parâmetros	Valores*	Parâmetros	Valores*
pH	3,9	As	na**
DBO	5046	Ba	0,41
DQO	13380	Cd	na**
Potássio	2056	Cr	0,04
Sódio	50,2	Cu	0,35
Sulfato	710	Hg	0,0019
Cálcio	719		
Magnésio	237		
Fósforo total	190		
Dureza	2493		

Tabela 1. Características físico-químicas da vinhaça. Adaptado de CHRISTOFOLETTI *et al.* (2013).

*Valores expressos em mg/L, exceto o pH.

** na: dados não avaliados.

O uso da vinhaça em bioprocessos apresenta potencialidade, visto que, este resíduo é rico em carbono e em alguns sais de potássio e de cálcio, tornando-se um substrato importante para o crescimento microbiano (CAMPOS *et al.*, 2014; HIGA *et al.*, 2014). Recentemente, a vinhaça foi descrita como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (LIMA; SOUZA, 2013; OLIVEIRA; GARCIA-CRUZ, 2013). O tratamento de vinhaça por meio de digestão anaeróbia é uma abordagem

promissora, uma vez que os subprodutos desse processo, metano (CH₄) e outros gases são produzidos em quantidade suficiente para produzir (3,6 a 10,6) MW de electricidade quando a DBO da vinhaça assume valores entre (17.000 e 50.000) mg/L, porém, tal processo ainda não é viável economicamente (HIGA *et al.*, 2014). A Tabela 2 resume as principais alternativas para o uso da vinhaça oriunda da cana-de-açúcar com as suas principais vantagens e desvantagens.

Além das aplicações listadas, a utilização da tecnologia de Células a Combustível Microbianas (CCMs) apresenta-se como promissora para o biotratamento deste efluente. Esta tecnologia promove simultaneamente o biotratamento de resíduos e a produção de energia elétrica, sendo ambientalmente sustentável (HIDALGO *et al.*, 2014). Diversos substratos, tais como glicose, sacarose e xilose; e, até mesmo, substratos complexos, tais como a palha de milho hidrolisada, águas residuais domésticas, efluentes de processamento de alimentos, de papel reciclado e matéria orgânica do sedimento aquático, têm sido utilizados em CCMs para a geração de energia elétrica e tratamento de resíduos (ZHANG *et al.*, 2011; PANT *et al.*, 2010; RACHINSKI *et al.*, 2010).

Processo/uso final	Vantagens	Desvantagens
Fertirrigação	Baixo custo Fácil de ser implementada	Elevado valor de transporte Falta de estudos sobre as consequências a longo prazo
Rações animais	Baixo custo Fácil de ser implementada	Poucos estudos
Biodigestão/Biogás	Produção de energia Redução da DBO Efluente utilizado como fertilizante	Custo elevado Tecnologia de ponta
Combustão em caldeiras	Eliminação completa Produção de energia Recuperação de potássio em cinzas	Poucos estudos Teste em pequena escala
Produção de proteínas	Alimentos	Custo elevado

Tabela 2. Aplicação de vinhaça: vantagens e desvantagens. Adaptado de CHRISTOFOLETTI *et al.* (2013).

As CCMs utilizam bactérias eletroquimicamente ativas que oxidam espécies orgânicas e inorgânicas convertendo-a em electricidade (JADHAV *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2013). Tipicamente, as CCMs compreendem dois compartimentos, um anódico e outro catódico, separados por uma membrana condutora de íons (CAMPO *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2010). O compartimento anódico de uma CCM é um reator de biofilme. O material utilizado no ânodo deve compartilhar propriedades comuns com outros reatores de biofilme, ou seja, alta área superficial específica, alta porosidade e com propensão limitada à incrustação ou à corrosão. Além disto, o ânodo deve ser altamente condutor, o que sugere ser constituído de prata, cobre, ouro, alumínio ou mesmo carbono; este último, por razões econômicas e de biocompatibilidade, é geralmente o selecionado, quer na forma de papel, tecido ou grânulos. O material

selecionado para o cátodo é normalmente o mesmo utilizado no ânodo, sendo frequentemente revestido com um catalisador para aumentar a velocidade de redução de oxigênio (LEFEBVRE *et al.*, 2011).

Mediante ao atual cenário de crise energética e da necessidade de utilização de resíduos, este estudo objetivou avaliar a potencial utilização da tecnologia CCM no tratamento de vinhaça reduzindo os impactos deste problema nacional.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

O protótipo de uma CCM de câmara dupla foi desenvolvido conforme apresentado na Figura 2. Os eletrodos foram constituídos de tecido de carbono (2,5 cm x 2,5 cm) aderidos a uma tela metálica. Neste sistema, a distância entre os eletrodos foi considerada nula, uma vez que, apenas uma membrana de permuta iônica (Nafion 117, DuPont Co.) foi utilizada para separar as câmaras anódica e catódica. Em acréscimo, os eletrodos foram conectados a uma resistência fixa de 1000 Ω (PEIXOTO *et al.*, 2013). Ambos os compartimentos possuíam o volume de trabalho de 50 mL. O compartimento anódico foi preenchido com vinhaça sintética (melaço) e inoculado com cultura pura de bactérias redutoras de sulfato (BRS-IPT 032) em volumes de 2, 4 e 6 mL. O compartimento catódico foi preenchido com meio sintético (tampão fosfato). Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando potenciostato/galvanostato PGSTAT 30 a cada 24 horas. Os açúcares foram medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com uma coluna Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories) e um sistema composto por: um detector diferencial de índice de refração e um processador de dados com registro (Waters, EUA). A demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada a cada 7 dias usando o kit HEXIS. O experimento foi realizado por um período de 28 dias em triplicata. Na CCM utilizada como controle não foi inserida BRS ao ânodo).

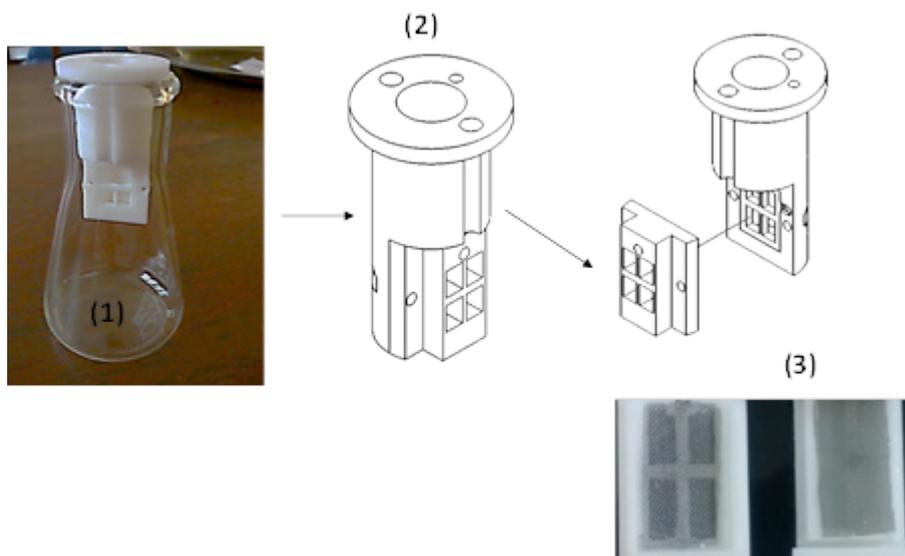


Figura 1. Representação esquemática da Célula a Combustível Microbiana: (1) câmara anódica; (2) câmara catódica; (3) eletrodos.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a relação entre a concentração de inóculo e a atividade da MFC observada foi direta e linear (Fig. 2A). Os maiores valores de densidade de potência (Fig. 2B) foram detectados na CCM contendo a maior concentração de inóculo, correspondente a $330 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$. Nenhuma atividade foi detectada no controle durante o período do estudo.

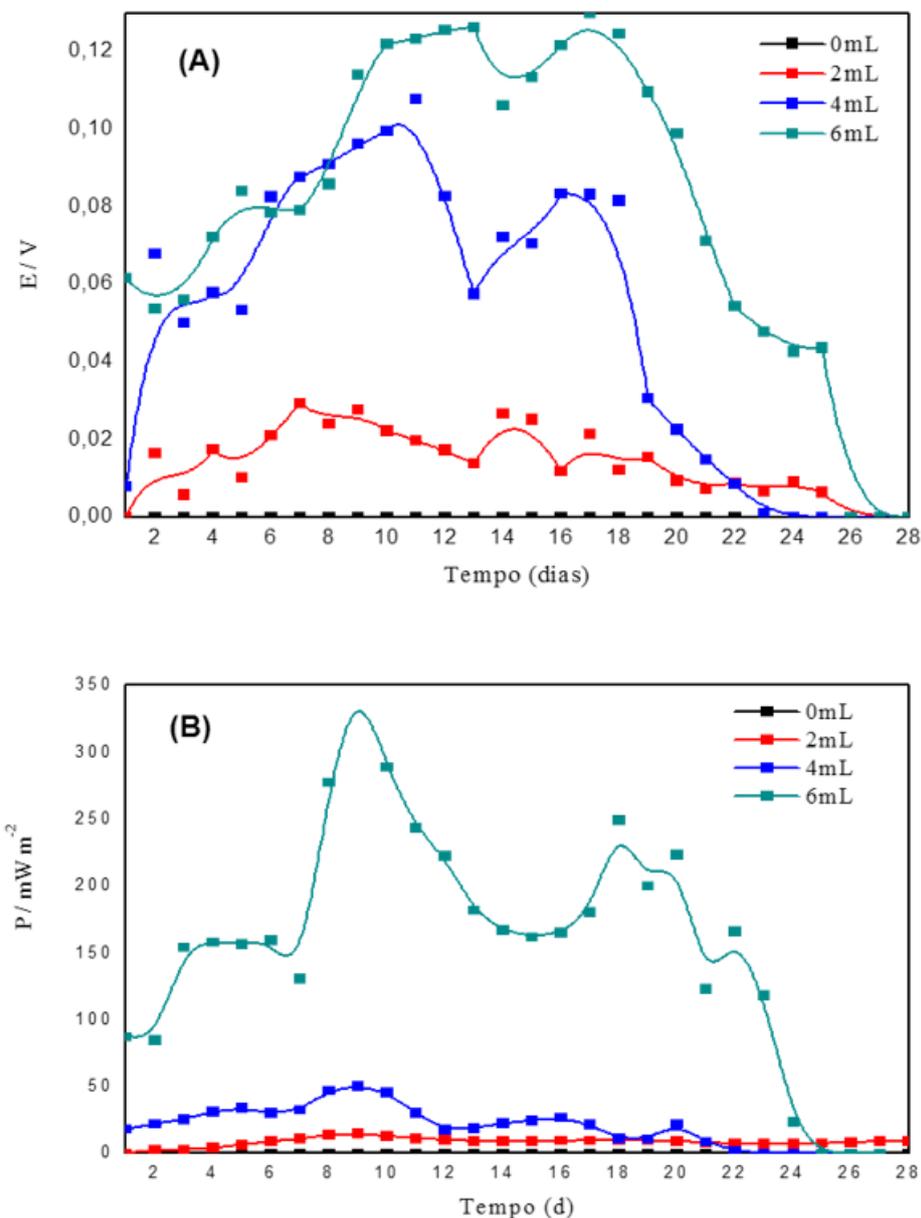


Figura 2. (A) Variação de circuito aberto; (B) Densidade de potência ($\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$).

O perfil de consumo dos açúcares que compunham a vinhaça sintética durante o processo foi também analisado (Fig. 3A, B, C). O tempo de consumo dos monossacarídeos ocorreu entre o sétimo e o décimo quarto dias, enquanto que, o consumo de sacarose ocorreu entre o oitavo e o vigésimo primeiro dia.

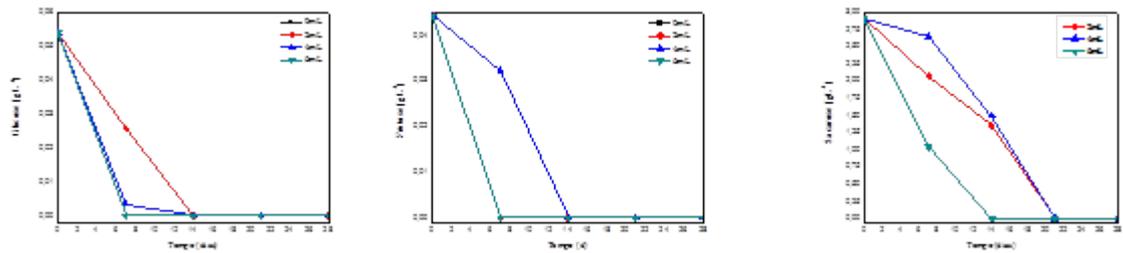


Figura 3. Consumo de açúcares: (A) glicose; (B) frutose; (C) sacarose.

Ao avaliar o desempenho da CCM para a redução da DQO (Fig. 4), foi detectado um valor próximo a 58,8%, o que pode ser justificado pelo reduzido tempo de condução do experimento executado em um único ciclo.

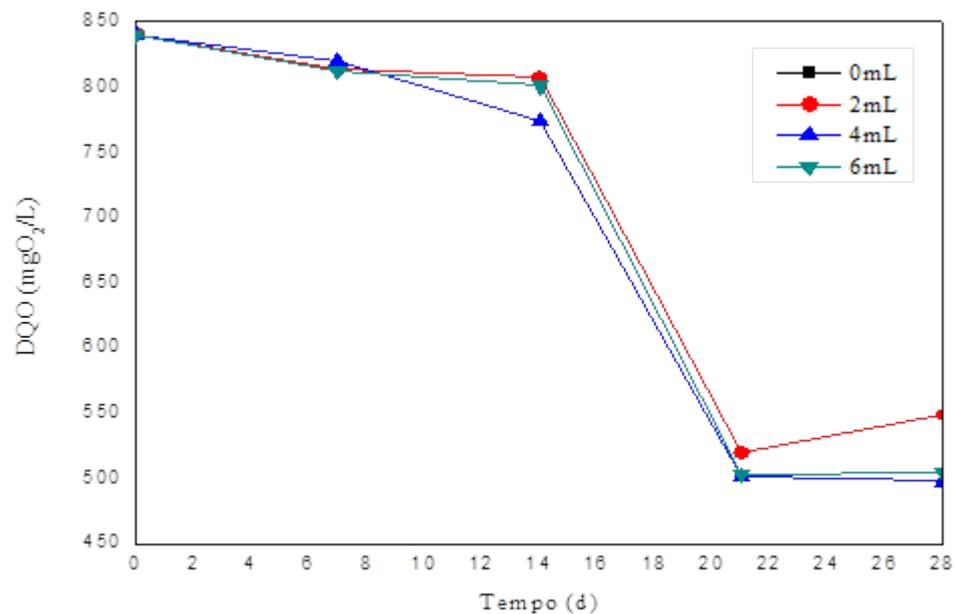


Figura 4. Redução da demanda química de oxigênio (DQO) de vinhaça na CCM ao longo de 28 dias de operação.

4 | CONCLUSÃO

Por meio da análise de nossos resultados preliminares, foi possível identificar a potencial aplicação da tecnologia CCM para o tratamento da vinhaça. No entanto, mais estudos sobre o melhor tipo de inóculo a ser utilizado no ânodo, de soluções com diferentes composições a serem utilizadas no cátodo, assim como, configurações e formas operação da CCM são necessários.

Para além dos fatores supracitados, são infimos os relatos em literatura que destacam esta técnica como forma de tratamento da vinhaça, tornando deste modo, um desafio para grupos emergentes trabalhos com tal abordagem.

REFERÊNCIAS

- CAMPO A.G.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M.A.; FERNÁNDEZ, F.J.; LOBATO, J. Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: A preliminary assessment. *Journal of Power Sources*, v.242, p.638-645, 2013.
- CAMPOS, C.R.; MESQUITA, V.A.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. *Waste Management*, v.34, p.2036-2046, 2014.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, v.33, p.2752-2761, 2013.
- HARDE, S.M.; BANKAR, S.B.; OJAMO, H.; GRANSTRÖM, T.; SINGHAL, R.S.; SURVASE, S.A. Continuous lignocellulosic ethanol production using *Coleus forskohlii* root hydrolysate. *Fuel*, v.126, p.77-84, 2014.
- HASSAN, S.H.A.; GAD EL-RAB S.M.F.; RAHIMNEJAD, M.; GHASEMI, M.; JOO, J-H.; SIK-OK, Y.; KIM, I.S.; OH, S-E. Electricity generation from rice straw using a microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.9490-9496, 2014.
- HIDALGO, D.; TOMMASI, T.; CAUDA, V.; PORRO, S.; CHIODONI, A.; BEJTKA, K.; RUGGERI, B. Streamlining of commercial Berl saddles: A new material to improve the performance of microbial fuel cells. *Energy*, v.71, p.615-623, 2014.
- HIGA, M.; CALDERANI, D.A.; LOPES, K.S. Electric power generation from anaerobic digestion of the sugar cane vinasse - Case study. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v.6, p.83-91, 2014.
- JADHAV, D.A.; GHADGE, A.N.; GHANGREKAR, M.M. Simultaneous organic matter removal and disinfection of wastewater with enhanced power generation in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, v.163, p.328-334, 2014.
- LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRE, E.A. Technological possibilities for the disposal of vinasse: a review. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, v.5, p.16-29, 2011.
- LAZARO, C.Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M.B.A. Sugarcane vinasse as Martínez substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.6407-6418, 2014.
- LEFEBVRE, O.; UZABIAGA, A.; CHANG, I.S.; KIM, B-H.; NG, H.Y. Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment-A review and discussion from energetic consideration. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, v.89, p.259-270, 2011.
- LIMA, A.M.; SOUZA, R.R. Use of Sugar Cane Vinasse as Substrate for Biosurfactant Production Using *Bacillus subtilis* PC. *Chemical Engineering Transaction*, v.37, p.673-678, 2013.
- MARTÍNEZ, S.H.; EIJCK, J.; CUNHA, M.P.; GUILHOTO, J.J.M.; WALTER, A.; FAIJ, A. Analysis of socio-economic impacts of sustainable sugarcane-ethanol production by means of inter-regional Input-Output analysis: Demonstrated for Northeast Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.28, p.290-316, 2013.
- MORAES, B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, L.G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO P.E.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, v. 113, p.825-835, 2014.

MORIMOTO, L.H.; RIZK, M.C.; Remoção de DQO da vinhaça utilizando processo oxidativo avançado e radiação UV solar. *IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental*. Centro de Eventos, Porto Alegre, 2014.

NAVA, J.L.; BUTRÓN, E.; GONZÁLEZ, I. Importance of hydrodynamic conditions on the electrochemical incineration of cresols, indigo textile dye and vinasses present in industrial wastewater using a filter-press-type FM01-LC reactor with BDD electrodes. *Journal of Environmental Management*, v.18, p.221-230, 2008.

OLIVEIRA, J.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.56, p.155-160, 2013.

OLIVEIRA, B.G.; CARVALHO, J.L.N.; CERRI, C.E.P.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. *Geoderma*, v.200-201, p.77-84, 2013.

PANT, D.; BOGAERT, G.V.; DIELS, L.; VANBROEKHOVEN K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology* v.101, p1533-1543, 2010.

PEIXOTO, L.; RODRIGUES, A.L.; MARTINS, G.; NICOLAU, A.; BRITO, A.G.; SILVA, M.M.; PARPOT, P.; NOGUEIRA, R. A flat microbial fuel cell for decentralized wastewater valorization: process performance and optimization potential. *Environmental Technology*, v.34, p.1947-1956, 2013.

PEIXOTO, L.J.S. Microbial Fuel Cells for autonomous systems: kinetics and technological advances in wastewater treatment and sensor applications. 2012. 166 f. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2012.

POTENTINI, M.F.; RODRÍGUEZ-MALAVERA, J. Vinasse biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Biology*, v.27, p.661-665, 2006.

RACHINSKI, S.; CARUBELLI, A.; MANGONI, A.P.; MANGRICH, A.S. Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro. *Química Nova*, v.33, p.1773-1778, 2010.

SÁ, L.R.V.; CAMMAROTA, M.C.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. *Química Nova*, v. 37, p. 857-867, 2014.

SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p.9599-9610, 2014.

SHARMA, V.; KUNDU, P.P. Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 47, p.179-188, 2010.

SYDNEY, E.B.; LARROCHE, C.; NOVAK, A.C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; LETTI, L.A.J.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 380-386, 2014.

YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—A byproduct of biodiesel production. *Biotechnology Biofuels*, v. 5, p.1-13, 2012.

ZHANG, Y.; MIN, B.; HUANG, L.; ANGELIDAKI, I. Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, v. 102, p.1166-1173, 2011.

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA GASEIFICAÇÃO DO LODO DE ESGOTO SANITÁRIO

Renan Barroso Soares

Universidade Federal do Espírito Santo,
Departamento de Engenharia Ambiental, Centro
Tecnológico, Vitória - Espírito Santo.
Faculdade Brasileira Multivix.

Ricardo Franci Gonçalves

Universidade Federal do Espírito Santo,
Departamento de Engenharia Ambiental, Centro
Tecnológico, Vitória - Espírito Santo.

RESUMO: O esgoto sanitário está, cada vez mais, sendo visto como fonte de recursos ao invés de resíduo. Isso porque das três maiores demandas atuais do mundo, água, energia e alimentos, duas podem ser extraídas diretamente do esgoto (água e energia), enquanto que a produção de alimentos é beneficiada com a recuperação de nutrientes importantes, tal como fósforo e nitrogênio. Além disso, com a depleção de combustíveis fósseis e o aumento das preocupações sobre os impactos ambientais causados por eles, o uso de recursos renováveis tem sido motivado. Vários processos têm sido estudados para valorizar o lodo de esgoto, como digestão anaeróbia, combustão e gaseificação. Este último será apresentado neste trabalho, como uma alternativa mais eficiente para a recuperação de energia, calor e produtos químicos valiosos, trazendo uma abordagem geral, útil para a divulgação da

técnica, ainda pouco considerada em relação à digestão anaeróbia e a combustão, devido a sua maior complexidade. Como poderá ser constatado, o processo de gaseificação de lodo apresenta vantagens aos processos tradicionais de estabilização do lodo, mas ainda precisa de maiores estudos para superar alguns desafios. **PALAVRAS-CHAVE:** gaseificação, bioprodutos, lodo de esgoto.

ABSTRACT: Sewage is increasingly seen as a source of resources rather than waste because of the three biggest demands in the world today, two can be extracted directly from it (water and energy), while food production benefits from the recovery of important nutrients, such as phosphorus. In addition, with the depletion of fossil fuels and increased concerns about their environmental impacts, the use of renewable resources has been motivated. Several processes have been studied to exploit sewage sludge and algae, such as anaerobic digestion, combustion and gasification. The purpose of this work is to present gasification as a more efficient alternative for the recovery of energy, heat and valuable chemicals, bringing a general approach, useful for the dissemination of the technique, still little considered in relation to others. Gasification presents advantages, but still needs further studies to overcome some challenges.

KEYWORDS: gasification, bioproducts, sewage sludge.

1 | INTRODUÇÃO

O saneamento básico melhora a saúde da população, protege o meio ambiente e traz benefícios econômicos para o país. Mesmo assim, 2,6 bilhões de pessoas no mundo não têm acesso adequado a este serviço, resultando em 2,2 milhões de mortos todos os anos (SIAESPH, 2016). Investimentos necessários para o setor são inviáveis, sobretudo nas cidades mais pobres, devido as condições econômicas da população, que limitam o repasse integral dos custos dos serviços para a tarifa (PROSAB, 2003). Por isso, a recuperação de bioprodutos valiosos, a partir do lodo produzido nas estações de tratamento de esgoto (ETE), pode melhorar a rentabilidade do setor, atraindo investimentos, que poderiam, não só melhorar os indicadores de saneamento, mas também, colocar o setor em um novo patamar de serviços, ancorado na sustentabilidade ambiental e econômica (PROBIOGAS, 2016). Além disso, os custos com o gerenciamento do lodo têm aumentado cada vez mais (PROBIOGAS, 2015) e a grande produção de microalgas em lagoas de estabilização é apontada como um problema neste tipo de tratamento (Chernicharo, 2007). Entre as opções de valorização do lodo, a gaseificação é um processo promissor

2 | O PROCESSO DE GASEIFICAÇÃO

A gaseificação é um processo termoquímico de oxidação parcial, em que substâncias carbonáceas são convertidas em gás, na presença de um agente gaseificante, usualmente ar, oxigênio, vapor d'água, dióxido de carbono ou suas misturas (Ruiz et al., 2013). O fluxo do agente gaseificante é controlado e a oxidação parcial ocorre em altas temperaturas (Heidenreich e Foscolo, 2015). O gás produzido, conhecido como singás, consiste principalmente de CO e H₂, misturados a outros componentes, como CH₄, CO₂, hidrocarbonetos leves, alcatrão, pequenas partículas de resíduos sólidos de carvão, espécies de metais alcalinos, cinzas e outros gases, como H₂S, HCl, NH₃, H₂O e N₂, que também podem estar presentes, a depender da biomassa, do tipo de gaseificador e das condições do processo (Molino et al., 2016, Ahmad et al., 2016, Asadullah, 2014, Ruiz et al., 2013).

O singás é um intermediário em energia, que pode ser queimado para produzir calor e eletricidade, sintetizado em combustível para transporte automotivo ou usado como matéria prima para a produção de produtos químicos de alto valor, tal como olefinas e formaldeído (Ahmad et al., 2016). A gaseificação do lodo de esgoto, normalmente produz um singás com poder calorífico entre 4 e 5,5MJ/m³ (Melfcalf & Eddy, 2016), cuja composição típica dos compostos combustíveis é apresentada na Tabela 1, retirada de Werle e Wilk (2010). Os valores do calor de combustão a 25°C

foram retirados de Perry et al. (1997).

Componente	Calor de Combustão (MJ/kg)	% volume
Hidrogênio, H ₂	119,94	8,89-11,17
Monóxido de carbono, CO	10,10	6,28-10,77
Metano, CH ₄	50,03	1,26-2,09
Acetileno ou Etino, C ₂ H ₂	48,28	0,62-0,95
Etano, C ₂ H ₆	47,51	0,15-0,27

Tabela 1 – Componentes combustíveis do singás de lodo de esgoto

O processo de gaseificação inclui uma série de sub-processos químicos e térmicos, em série e em sequência, podendo ser dividido em quatro estágios: secagem, pirólise, oxidação e redução (Manara e Zabaniotou, 2012). Na zona de secagem, a umidade da biomassa se torna vapor e na zona de pirólise o material orgânico volátil é destilado do carbono fixo. O carbono sólido e o material volátil entram então, nas zonas de oxidação e redução e reagem com o agente gaseificante, produzindo singás (Asadullah, 2014). Excluindo-se o estágio de oxidação, que é exotérmico, todos os demais são endotérmicos, necessitando de energia, que é suprida pela oxidação parcial da biomassa alimentada. Para que somente uma parte da biomassa seja oxidada, o processo ocorre em condições limitantes, com disponibilidade de oxigênio abaixo da estequiometria (Molino et al., 2016), entre 20 e 40% (Ruiz et al., 2013). O processo como um todo é auto-suficiente em energia (Manara e Zabaniotou, 2012). Reatores típicos de gaseificação de lodo de esgoto operam entre 800 e 1400°C e podem render, em frações mássicas, até 90% em singás (Manara e Zabaniotou, 2012). O processo pode ser conduzido em pressões que variam da atmosfera até 33bar (Ahmad et al., 2016).

A gaseificação é influenciada por diversos parâmetros operacionais, como temperatura, pressão, características da biomassa, tipo do gaseificador, agente gaseificante etc e, por isso, é considerada uma tecnologia complexa. Variações nesses parâmetros podem gerar instabilidade no sistema e perda de performance. Por outro lado, a versatilidade do processo permite a obtenção de vários produtos, além de calor e energia (Ruiz et al., 2013), além de vantagens adicionais. A gaseificação do lodo é um processo de estabilização definitivo, com destruição de patógenos e substâncias tóxicas orgânicas, o que é uma vantagem sobre os biodigestores (Zabaniotou e Samolada, 2014). Além disso, a energia da gaseificação tem maior potencial para a produção de eletricidade do que a energia da digestão anaeróbica (Gikas, 2016). Se comparada a incineração, a técnica supera os problemas encontrados na incineração, como necessidade de combustível adicional, emissões de óxidos de enxofre e nitrogênio, metais pesados, cinzas, além de reduzir o potencial de produção de dibenzofuranos e dioxinas cloradas (Manara e Zabaniotou, 2012).

3 | RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA GASEIFICAÇÃO

O singás é um intermediário chave na indústria química, que pode ser usado em várias sínteses, em um grande range de produtos químicos e combustíveis, tal como o diesel sintético, etanol, metanol, amônia, além de ser fonte para obter CO, CH₄ e H₂ puros (Ahmad et al., 2016). Espera-se que o hidrogênio substitua a gasolina e o diesel no futuro (Nipattumakul et al., 2010) e a gaseificação é o processo mais efetivo para sua obtenção a partir de biomassa (Ahmad et al., 2016). A recuperação de biometano também é possível, com a grande vantagem de poder ser alimentado na rede de gás natural (Molino et al., 2016). Aquecedores, caldeiras e motores tão bem como carros e ônibus movidos a gás natural são tecnologias limpas, estabelecidas e disponíveis para o uso de biometano. A produção de eletricidade e calor com biometano também é uma opção, podendo ser feita em pequenas e médias escalas, entre 20 e 100MW, embora sua eficiência como combustível veicular seja maior (Heidenreich e Foscolo, 2015).

A produção de etanol a partir do singás pode ser feita por 2 processos: fermentação, onde os micro-organismos transformam o CO, CO₂ e H₂ em acetil e, posteriormente etanol, e conversão catalítica. A fermentação é mais barata, uma vez que os catalisadores ideais para uma conversão seletiva, tal como o ródio, são caros. Catalisadores de cobre são usados, junto com promotores (metais de transição e seus óxidos) para minimizar as reações indesejadas, numa tentativa de reduzir os custos do processo, e também podem produzir metanol. Uma alta produção de álcool é atingida em temperaturas de 833 a 858°C. A produção do biodiesel é baseada na síntese de Fischer Tropsch, uma liquefação indireta da biomassa, na presença de catalisador. Neste processo, o singás é alimentado no reator, onde ocorre uma reação entre H₂ e CO, produzindo água e hidrocarbonetos. As temperaturas e pressões na síntese de Fischer Tropsch ficam entre 693 a 893°C e 1 a 30atm, respectivamente. A produção de dimetil éter pode ser realizada com catalisadores específicos, tal como zeólita de cobre ZSM-5, podendo ser condensado e usado como líquido combustível, tal como o gás liquefeito de petróleo (GLP). Alguns autores também têm explorado o alcatrão presente no singás para a geração de biodiesel. Processos de catálise térmica forneceram 75% de biodiesel em peso da alimentação, a 953°C. Na presença de zeólita, óxido de magnésio e óxido de alumínio, a produção máxima de biodiesel foi de 75%, 66% e 71%, respectivamente (Molino et al., 2016).

A queima do singás pode produzir calor e energia, sem produção de resíduo e dentro dos limites de emissão de gases (Ruiz et al., 2013). Várias plantas de energia são abastecidas com singás, sem nenhum problema relatado, embora a eficiência seja baixa, de 15 a 35% para caldeiras de 150MWth. Quando usado em turbinas, a eficiência pode atingir 40%, mesmo em escalas menores que 50MWth, e quando acoplado a um sistema de recuperação de calor a eficiência pode atingir de 70 a 90%. Em motores de combustão interna, a eficiência obtida varia entre 35 e 45% (Molino et al., 2016). O singás ainda pode gerar energia em células de combustível (Manara e

Zabaniotou, 2012).

Apesar de todo este potencial e crescimento do mercado, poucas plantas de gaseificação de biomassa estão em operação no momento. Na Europa, existem 22 plantas operando, sendo 16 usadas para geração de calor e energia, 4 para co-combustão e 2 dedicadas a fabricação de produtos químicos. Geralmente, essas plantas não produzem mais do que 1MWe, com poucas unidades capazes de produzir biocombustível como álcool e diesel. Em muitos casos, a gaseificação é apenas um pré-estágio da combustão completa, uma vez que queimar o singás é mais eficiente e menos poluidor, se comparado a queima direta da biomassa (Molino et al., 2016). Além do mais, apenas 0,5% das plantas de gaseificação no mundo utilizam biomassa, sendo predominante o uso de carvão (51%), resíduos da refinaria do petróleo e nafta (25%) e gás natural (22%) (Ahmad et al., 2016). A complexidade do processo e a presença dos contaminantes, que emanam dos constituintes orgânicos e inorgânicos voláteis da biomassa, e podem causar problemas operacionais, como corrosão de equipamentos, incrustação, desativação de catalisadores e até poluição do meio ambiente, colaboram para essa realidade (Abdoulmoumine et al., 2015). A remoção de alcatrão no singás é o maior desafio técnico para o desenvolvimento da tecnologia e pode ser considerada o calcanhar de Aquiles da gaseificação de biomassa (Molino et al., 2016). Ele reduz o rendimento de singás e, quando se condensa, entope tubulações, filtros, unidades catalíticas motores e etc (Heidenreich e Foscolo, 2015). Sua presença ainda afeta o uso final do singás, limitando algumas aplicações (Molino et al., 2016).

4 | CONCLUSÕES

Diferente de outras fontes de energia renováveis, a biomassa não tem limitações geográficas, como é o caso de outros tipos de energia renovável, tal como eólica e a solar. Apesar da menor publicidade, a produção de energia a partir de lodo de esgoto é possível, com a vantagem adicional de ser um processo descentralizado, com geração nas cidades, onde o consumo é maior. Dentre os processos, a gaseificação se apresenta como um caminho promissor, uma vez que outros produtos, além de calor e eletricidade, são possíveis de serem obtidos, tal como compostos da indústria química e biocombustíveis líquidos. Além do mais, o lodo é um resíduo que contribui com as despesas do saneamento básico e, por isso, sua valorização colabora para melhorias econômicas no setor, ainda deficitário no país. No entanto, o processo ainda depende de incentivos fiscais e de redução de CO₂ para se tornar competitivo, frente aos sistemas baseados nos derivados de petróleo. Para baratear os processos, melhorar a eficiência e superar as dificuldades técnicas da gaseificação do lodo, novos conceitos de gaseificação têm surgido, envolvendo a integração das etapas de produção e limpeza do singás, plantas com produção de múltiplos produtos e novos meios para gaseificação. Atualmente, mesmo com menor rendimento de eletricidade

e necessidade de uma etapa adicional para completar a estabilização do lodo, os digestores anaeróbios são usualmente escolhidos nas ETE, pela menor complexidade, se comparado aos gaseificadores, que ainda precisam de maiores estudos para consolidação da tecnologia.

REFERÊNCIAS

ABDOULMOUMINE, N.; ADHIKARI, S.; KULKAMI, A.; CHATTANATHAN, S. **A review on biomass gasification syngas cleanup**. Appl. Energy, v. 155, p. 294-307, 2015.

AHMAD, A. A.; ZAWAWI, N. A.; KASIM, F. H.; INAYAT, A.; KHASRI, A. **Assessing the gasification performance of biomass: a review on biomass gasification process conditions, optimization and economic evaluation**. Renew. Sust. Energ. Rev., v. 53, p. 1333-1347, 2016.

ASADULLAH, M. **Barriers of commercial power generation using biomass gasification gas: a review**. Renew. Sust. Energ. Rev., v. 29, p. 201-215, 2014.

CHERNICHARO, C. A. L. **Anaerobic Reactors**. Biological Wastewater Treatment Series, Volume 4. Londres: IWA Publishing, 2007.

GIKAS, P. **Towards energy positive wastewater treatment plants**. J. Environ. Manag., v.203, p. 621-629, 2017.

HEIDENREICH, S.; FOSCOLO, P. U. **New concepts in biomass gasification**. Progr. Energy Combust. Sci., v. 46, p. 72-95, 2015.

MANARA, P.; ZABANIOTOU, A. **Towards sewage sludge based biofuels via thermochemical conversion - a review**. Renew. Sust. Energ. Rev. v. 16, p. 2566-2582, 2012.

METCALF & EDDY. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. Editora AMGH, 5ª Edição, 2013. Tradução Ivanildo Hespanhol e José Calos Mierzwa, 2016.

MOLINO, A.; CHIANESE, S.; MUSMARRA, D. **Biomass gasification technology: the state of the art overview**. J. Energy Chem., v. 25, p. 10-25, 2016.

NIPATTUMMAKUL, N.; AHMED, I. I.; KERDSUWAN, S.; GUPTA, A. K. **Hydrogen and syngas production from sewage sludge via steam gasification**. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 11738-11745, 2010.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. **Perry's Chemical Engineer's Handbook**, 7ª Edição. Editora Mc Graw-Hill, Nova Iorque: 1997.

PROBIOGAS - Projeto Brasil - Alemanha de Fomento ao Aproveitamento Energético de Biogás no Brasil. **Viabilidade técnico-econômica de produção de energia elétrica em ETEs a partir do biogás**. Brasília: 2016.

PROBIOGAS - Projeto Brasil - Alemanha de Fomento ao Aproveitamento Energético de Biogás no Brasil. **Guia técnico de aproveitamento energético de biogás em ETEs**. Brasília: 2015.

PROSAB, Programa Nacional de Saneamento e Pesquisa. **Digestão de resíduos orgânicos e aproveitamento do biogás**. Rio de Janeiro: 2003.

RUIZ, J. A.; JUÁREZ, M. C.; MORALES, M. P.; MUÑOZ, P.; MENDÍVIL, M. A. **Biomass gasification for electricity generation: review of current technology barriers**. Renew. Sust. Energ. Rev., v. 18, p. 174-183, 2013.

SIAESPH, Sulabh International Academy of Environmental Sanitation and Public Health. **Sanitation and energy**. New Delhi: 2016.

ZABANIOTOU, A. A.; SAMOLADA, M. C. **Comparative assessment of municipal sewage sludge incineration, gasification and pyrolysis for a sustainable sludge-to-energy management in Greece**. Waste Manag., v. 34, p. 411-420, 2014.

WERLE, S.; WILK, R. K. **A review of methods for the thermal utilization of sewage sludge: The Polish perspective**. Renewable Energy, v. 35, p. 1914-1919, 2010.

BIOPROSPECTING CAROTENOIDS PRODUCTION IN THREE BRAZILIAN MICROALGAE SPECIES

Sabrina da Silva Mesquita

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Departamento de Engenharia Bioquímica
Rio de Janeiro – RJ

Natália Guimarães Figueiredo

Instituto Nacional de Tecnologia, Divisão de
Química Analítica
Rio de Janeiro – RJ

Inaiã Costa Cutrim

Instituto Nacional de Tecnologia, Divisão de
Química Analítica
Rio de Janeiro – RJ

Simone Carvalho Chiapetta

Instituto Nacional de Tecnologia, Divisão de
Química Analítica
Rio de Janeiro – RJ

Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Instituto Nacional de Tecnologia, Divisão de
Energia
Rio de Janeiro – RJ

Eliana Flávia Camporese Sérvulo

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Departamento de Engenharia Bioquímica

RESUMO: Carotenoides são corantes naturais com coloração amarelo, laranja e vermelho que podem ser produzidos por alguns organismos. Estes corantes são uma interessante alternativa ao uso de corantes artificiais na indústria de alimentos, por serem seguros e apresentarem

propriedades funcionais. Dentre as fontes microbianas produtoras de carotenoides, encontram-se algumas espécies de microalgas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de carotenoides em três espécies de microalgas brasileiras, durante a fase estacionária de crescimento, e avaliar se houve a produção de β -caroteno ou cantaxantina. O maior rendimento obtido em carotenoides totais foi nos cultivos da espécie *Haematococcus pluvialis*. Todas as espécies estudadas produziram β -caroteno e somente a espécie *Golenkinia radiata* produziu cantaxantina. Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que a espécie *H. pluvialis* foi a melhor produtora de carotenoides totais. Ademais, a espécie *G. radiata*, pouco estudada na literatura, necessita ser mais explorada na tentativa de compreender as condições de cultivo favoráveis à indução da produção de cantaxantina.

PALAVRAS-CHAVE: carotenoides, β -caroteno, cantaxantina, microalgas.

ABSTRACT: Carotenoids are natural dyes produced by some organisms, which comprises colors like yellow, orange and red. They are safe and healthy which makes them interesting alternatives for replacing artificial coloring in food industry. Among microbial sources of carotenoids, some microalgae species stand out. Thus, the purpose of this study was to

evaluate carotenoids production by three Brazilian microalgae species on stationary growth phase and evaluate the production of β -carotene or canthaxanthin. High total carotenoids yield was obtained in *Haematococcus pluvialis* cultivates. All studied species were able to produce β -carotene and only *Golenkinia radiata* produced canthaxanthin. It was possible to conclude with the presented results that *H. pluvialis* was the best producer of total carotenoids. Furthermore, the *G. radiata* species, which was few studied in literature, needs to be explored in attempt to understand the favorable conditions to the induction of canthaxanthin production.

KEYWORDS: carotenoids, β -carotene, canthaxanthin, microalgae.

1 | INTRODUCTION

The increasingly awareness of the consumer market regarding the use of natural products has stimulated the addition of natural dyes to the food industry. Carotenoids are natural colorants which present colors like yellow, orange and red. Also, they can be produced by some plants, macroalgae and microorganisms such as fungus, bacteria and microalgae. The production of carotenoids by microorganisms has been shown to be more advantageous than the traditional extraction from plants sources, since it enables short time production regardless the season (Valduga et al., 2009). Some microalgae species produce large carotenoids amounts, like canthaxanthin and β -carotene, which can act as antioxidants, preventing many types of cancer, cardiovascular diseases and others. Considering the Brazilian biodiversity and few bioprospecting studies concerning carotenoids production by Brazilian microalgae, this work aimed to evaluate the total carotenoids production and whether carotenoids canthaxanthin and β -carotene are produced by three Brazilian microalgae species.

2 | MATERIALS AND METHODS

The native microalgae species used in carotenoids bioprospecting were: *Chlorella zofingiensis*, *Haematococcus pluvialis* and *Golenkinia radiata*. Initially, it was necessary to obtain pre-inoculum cultures. For this, each species was cultivated in conic flasks of 500 mL, containing 300 mL of WC culture medium without silica, under orbital shake at 180 rpm, $200 \pm 10 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of irradiance, and in a controlled room temperature (23 – 27°C). After reaching the exponential growth phase, each culture was inoculated in 300 mL of new WC medium and submitted to the same pre-inoculum conditions to start the carotenoids bioprospecting experiments. These experiments were finalized at stationary growth phase. Cell growth was evaluated by direct counting using microscope and by gravimetric method (cell dry weight). Nitrate consumption was analyzed according to Collos et al. (1999). For carotenoids analysis, cultures were previously vacuum filtered on glass fiber membranes and pigments from the

filtered cells were extracted using acetone 100%. Total carotenoids concentration was estimated in accordance with Lichtenthaler (1987). The extracts were also analyzed using high performance liquid chromatography to identify the presence of β -carotene or canthaxanthin, according to Guarantini et al. (2009).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

In table 1, it is possible to observe that *H. pluvialis* had the shortest cultivation time and nitrate consumption. In addition to that, the best results of total carotenoids production (total carotenoids in culture, $Y_{P/X}$, total carotenoids percentage in dry biomass, Q_p and intracellular total carotenoids quantity) were reached by this microalgae species. Reports on carotenoids production by microalgae indicate that some species are able to overproduce these pigments under stress growth conditions by secondary metabolism. Among stress factors, there is nutrient privation, mainly nitrate, and high light irradiance. These stressors increase the formation of intracellular free radicals, which leads to a production of carotenoids in order to protect microalgae cells against deleterious effects caused by these radicals. In relation to the studied *H. pluvialis* cultivation, it is noted that there was no nitrate starvation to induce carotenoids production. Therefore, two hypotheses are suggested: the starvation of another nutrient, like phosphate, might have induced the carotenoid production (Imamoglu; Dalay; Sukan, 2009) or the irradiance used was sufficient for this induction.

		Microalgae Species		
		<i>C. zofingiensis</i>	<i>G. radiata</i>	<i>H. pluvialis</i>
Cultivation Time (d)		18	13	4
NO_3^- Consumption (%)		97	95	25
Total Carotenoids Production	mg/L	0,40 \pm 0,04	0,71 \pm 0,09	3,44 \pm 0,19
	$Y_{P/X}$ (mg/g)	0,98 \pm 0,07	2,06 \pm 0,11	11,51 \pm 0,46
	% d.b.	0,1	0,2	1
	pg/cell	0,03 \pm 0,005	4,7 \pm 0,75	27 \pm 3,33
	Q_p (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	0,02 \pm 0,002	0,05 \pm 0,007	0,86 \pm 0,05
Qualitative Analysis	β -carotene	Detected	Detected	Detected
	Canthaxanthin	Not detected	Detected	Not detected

Table 1. Total carotenoids production, qualitative analysis and nitrate consumption
% d.b.: Total carotenoids percentage in dry biomass. $Y_{P/X}$: Total carotenoids yield in dry biomass. Q_p : Global productivity of total carotenoids.

Regarding the production of 3,44 mg/L total carotenoids in culture and 11,51 mg/g of total carotenoids yield by *H. pluvialis*, it is possible to verify that these results were higher than 1,7 mg/L and 3,5 mg/g obtained by Goksan and Ak (2006) with another *H. pluvialis* strain. In relation to the results achieved on cultivation of *C. zofingiensis* and *G. radiata*, it is noted that these species used almost all the available nitrate (table 1),

creating a stressor condition. However, as observed in table 1, the nitrate starvation was not significant enough to induce the production of a large quantity of total carotenoids by *C. zofingiensis* and *G. radiata*. Pelah, Sintov and Cohen (2004) cultivated another strain of *C. zofingiensis*, whose total carotenoid yield was around ten times higher than the one presented in this present work. Among all the studied species, *G. radiata* was the second with the shortest cultivation time and also the second that presented the best total carotenoids production. Nevertheless, the total carotenoids percentage in biomass was five times lower than the percentage obtained by *H. pluvialis* and other carotenoids overproduction species found in studies like *Dunaliella bardawil*, which can produce up to 10% of biomass corresponding to β -carotene (Ben-Amotz; Avron, 1990) or *H. pluvialis* which can accumulate around 4% of biomass corresponding to astaxanthin. It was not possible to compare *G. radiata* exposed results with other studies, because there is no research on carotenoids with this species. As noted in table 1, under the studied cultivation conditions, the canthaxantin production was detected only on *G. radiata* extract. In general, in some microalgae species, this carotenoid is overproduced in response to a stressor factor. Thus, there is a possibility that *G. radiata* is a carotenoid overproduction, but it is necessary to optimize culture conditions to induce synthesis of a large quantity of canthaxanthin. Although some studies have reported the production of canthaxanthin by *H. pluvialis* and *C. zofingiensis*, under experimental conditions of the present study, it did not happen. Concerning the β -carotene production, it is noted that all species were able to produce this pigment. Research shows that β -carotene is not overproduced by *H. pluvialis* and *C. zofingiensis*, but there is no register about *G. radiata*.

4 | CONCLUSION

With the presented results, it is possible to conclude that there are Brazilian microalgae species with potential of carotenoids production. *G. radiata* is the only one that is not already studied on literature. Therefore, it is necessary to study culture conditions to understand what is favorable for canthaxanthin and β -carotene accumulation by *G. radiata*. Both carotenoids are interesting for food and pharmaceutical industries and present high commercial value, but canthaxanthin has an advantage as it presents a higher antioxidant activity when compared with β -carotene. Moreover, it is necessary to evaluate another culture conditions for *H. pluvialis* and *C. zofingiensis* to induce canthaxanthin production and optimize the productivity. After reaching the optimum of each specie, it will be possible to evaluate which species is the best producer.

REFERENCES

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. **The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella***. Trends in Biotechnology, v. 8, p. 121-128, 1990.

COLLOS, Y. et al. **An Optical Method For The Rapid Measurement of Micromolar Concentrations of Nitrate in Marine Phytoplankton cultures**. Journal of Applied Phycology, v. 11, p. 179-184, 1999.

GOKSAN, T.; AK, I. **Vegetative growth of the green alga *Haematococcus pluvialis* cultivated in different light-path lengths**. Asian Journal of Plant Science, v. 5, p. 455-460, 2006.

GUARANTINI, T. et al. **Comparision of Diode and Electrochemical Detection in C30 Reverse Phase HPLC Analysis of Algae Carotenoids**. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 0, p. 1-8, 2009.

IMAMOGLU, E.; DALAY, M. C. SUKAN, F. V. **Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis***. New Biotechnology, v. 26, 199-204, 2009.

LICHTENTHALER, H. K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes**. Methods in Enzimology, v. 148, p. 350-382, 1987.

PELAH, D.; SINTOV, A.; COHEN, E. **The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 20, p. 483-486, 2004.

VALDUGA, E. et al. **Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais**. Química Nova, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

EFFECT OF TEMPERATURE AND SALINITY ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND LIPIDS BY MARINE MICROALGA

Nicéia Chies Da Fré

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Feliz
Feliz – RS

Alessandro de Oliveira Rios

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Porto Alegre – RS

André Jablonski

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Porto Alegre – RS

Rosane Rech

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Porto Alegre – RS

Nilson Romeu Marcílio

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Engenharia Química
Porto Alegre – RS

RESUMO: Esta pesquisa identificou os carotenoides presentes no extrato de *Dunaliella tertiolecta* e avaliou os efeitos da temperatura e da salinidade do meio na composição elementar e nos teores de lipídios e carotenoides desta

microalga marinha cultivada em um fotobiorreator airlift. Os experimentos foram realizados de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR). Seis carotenoides foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): *trans*-luteína, *trans*- β -caroteno, *trans*-zeaxantina, *trans*-neoxantina, *trans*-anteraxantina e 9-*cis*- β -caroteno. As condições ideais para a produção de carotenoides e lipídios por *D. tertiolecta* foram de 27 a 29 ° C e 0,7 a 0,8 M de NaCl. Nas condições testadas, as maiores quantidades de lipídios, luteína, β -caroteno e zeaxantina obtidas foram, respectivamente, $11,75 \pm 1,8 \%$, $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$, $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$ and $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$.

PALAVRAS-CHAVE: *Dunaliella tertiolecta*, airlift, carotenoides, lipídios.

ABSTRACT: This research identified the carotenoids present in *Dunaliella tertiolecta* extract and evaluated the effects of temperature and medium salinity on the elemental composition and lipid and carotenoid contents of this marine microalga cultured in a flat-panel airlift photobioreactor. The experiments were performed according to a central composite design (CCD). Six carotenoids were identified by high-performance liquid chromatography (HPLC): all-*trans*-lutein, all-*trans*- β -carotene, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-neoxanthin, all-

trans-antheraxanthin and 9-*cis*- β -carotene. The ideal conditions for carotenoid and lipid production by *D. tertiolecta* were 27 to 29 °C and 0.7 to 0.8 M NaCl. Under test conditions, the greatest amounts of lipid, lutein, β -carotene and zeaxanthin obtained were, respectively, $11.75 \pm 1.8 \%$, $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$, $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$ and $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$.

KEYWORDS: *Dunaliella tertiolecta*, airlift, carotenoid, lipids.

1 | INTRODUCTION

The potential of microalgae as a commercial source of carotenoids and polyunsaturated fatty acids is widely recognised (Derner *et al.*, 2006). Carotenoids, such as β -carotene, lutein and zeaxanthin have a wide variety of market applications: natural food colouring agent; components in cosmetics and health foods; diagnostics and biomedical research (Francavilla *et al.*, 2010). In addition to their colouring properties, the carotenoids are known to have several others biological functions, including the enhancement of pro-vitamin A activity, cancer-preventing effects, cardiovascular disease protective effects and the reduction of cataract risks and age-related macular degeneration (Del Campo *et al.*, 2000; Raja *et al.*, 2007). Additionally, *Dunaliella* cells are rich in lipids and antioxidants, can be used as food supplement or food additive (Tafreshi and Shariati, 2009).

Large-scale production of microalgae bio-products is controlled by several environmental parameters as salinity, temperature, light intensity and nutrient availability (Baudeflet *et al.*, 2017; Benavente-Valdés *et al.*, 2016). The use of closed bioreactors provides controlled and aseptic conditions for cultivation and efficient light utilisation, resulting in a consistent product quality and high cell densities (Raja *et al.*, 2007).

Dunaliella is a unicellular green alga (Chlorophyta, Chlorophyceae), found from mixed and euryhaline to hypersaline waters (Francavilla *et al.*, 2010). The salt tolerance of *Dunaliella tertiolecta* has been reported to be up to 3 M of NaCl (Jahnke and White, 2003).

In this paper, we report the effects of two key physicochemical variables, temperature and medium salinity (without interference from high concentrations of nutrients, such as nitrogen and carbon dioxide), on the production of lutein, β -carotene, zeaxanthin and total lipids by *D. tertiolecta*. From the analysis of the results, we report the optimal conditions for maximising the formation of bio-products. We present and discuss profiles of obtained carotenoids (all-*trans* forms of lutein, β -carotene, zeaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin and 9-*cis*- β -carotene) as a function of growth conditions. Due to the expected increase in worldwide demand for these natural components, the findings of this study could lead to better industrial exploitation of *D. tertiolecta* biomass for carotenoid and lipid production.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganism and Culture Medium

Marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* BE 003 was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology, Federal University Fluminense (Niterói, Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in f/2 medium (Guillard, 1975).

2.2 Photobioreactor Cultivation

The experiments were performed in flat-panel airlift photobioreactors (Kochem *et al.*, 2014). The aseptic photobioreactors were filled with 2.0 L of sterile f/2 medium and inoculated with 200 mL of algae pre-culture to a total 2.2 L working volume.

The cultures were performed in triplicate according to a central composite design at different temperatures (21 °C, 23 °C, 28 °C, 33 °C and 35 °C) and salinities (0.430 M, 0.513 M, 0.715 M, 0.917 M and 1.000 M). Different concentrations of NaCl were added to the medium to achieve the required salinity. The photobioreactors were continuously illuminated on the riser side at light intensity of 18 klx, and the airflow rate was kept at 0.5 L min⁻¹. At the end of the experiment, the entire biomass content was centrifuged (3000 × *g*, 10 min) and lyophilised.

2.3 Biomass Analysis

The carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur contents of lyophilised biomasses were analysed in duplicate using an elemental analyser (ELEMENTAR Analysensysteme BmbH, model VARIOEL V5 19.9.23, Hanau, Germany). The lipid content was determined by the weight difference before and after extraction with petroleum ether (at 135 °C) using Soxhlet equipment (Foss/Soxtec 2055TM, Hillerød, Denmark). The carotenoids were extracted from the freeze-dried biomass and analysed by HPLC as described previously (Mercadante and Rodriguez-Amaya, 1998; Zanatta and Mercadante, 2007; Chagas *et al.*, 2015). For quantification, calibration curves were constructed for β-carotene (5 – 50 µg mL⁻¹), lutein (1 – 65 µg mL⁻¹) and zeaxanthin (1 – 40 µg mL⁻¹). The carotenoid standards were acquired from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). The limits of quantitation (LOQ) and detection (LOD) were respectively, 10.89×10⁻² µg g⁻¹ and 6.53×10⁻² µg g⁻¹ for β-carotene, 1.15×10⁻² µg g⁻¹ and 6.9×10⁻³ µg g⁻¹ for lutein and 1.59×10⁻² µg g⁻¹ and 9.56×10⁻² µg g⁻¹ for zeaxanthin. Carotenoid quantification was performed by comparing the peak area of the sample with that of standards.

2.4 Statistical Analysis

Experimental data were analysed using *Statistica* 12.0 software (StatSoft, Inc. Tulsa, United States). Experimental results were approximated by a quadratic

polynomial equation (Equation 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_T x_T + \beta_S x_S + \beta_T^2 x_T^2 + \beta_S^2 x_S^2 + \beta_{TS} x_T x_S, \quad (1)$$

where x_T and x_S are regression variables (temperature and salinity, respectively), and Y represents the dependent variable, in these cases, lipid, β -carotene, lutein or zeaxanthin contents. The symbols β_0 , β_T , β_S , β_T^2 , β_S^2 and β_{TS} are regression coefficients of the model.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The carotenoid extract from *D. tertiolecta* showed six peaks as separated by HPLC (Figure 1 and Table 1). Peaks 3, 4 and 5 were all-*trans* forms of lutein, zeaxanthin and β -carotene, respectively. Peaks 1, 2 and 6 were identified based on the wavelengths of maximum absorption (λ_{max}) and spectral fine structural values (% III/II). The data agreed well with those of the literature for all-*trans*-neoxanthin, all-*trans*-antheraxanthin and 9-*cis*- β -carotene, respectively (De Rosso and Mercadante, 2007; Hu *et al.*, 2008).

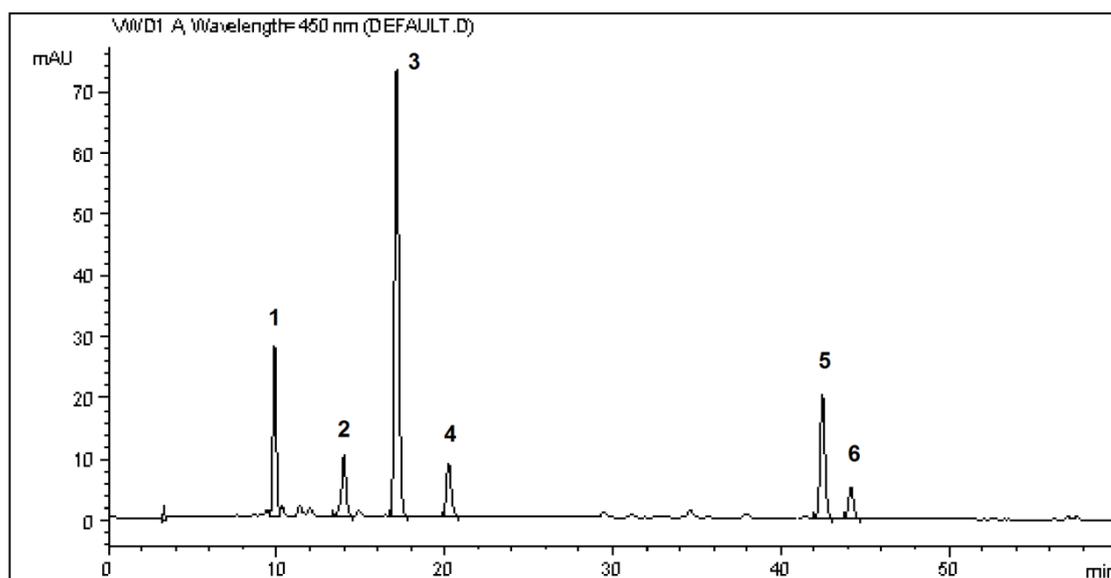


Figure 1: HPLC chromatogram of carotenoid extract from *Dunaliella tertiolecta*. Peak identification: (1) all-*trans*-neoxanthin, (2) all-*trans*-antheraxanthin, (3) all-*trans*-lutein, (4) all-*trans*-zeaxanthin, (5) all-*trans*- β -carotene, (6) 9-*cis*- β -carotene.

Peak number	Compound	Retention time (min)	λ_{\max} (nm)			% III/II
1	all- <i>trans</i> -neoxanthin	9.9	415	438	468	85
2	all- <i>trans</i> -antheraxanthin	14.0	420	444	472	50
3	all- <i>trans</i> -lutein	17.1	418	443	471	60
4	all- <i>trans</i> -zeaxanthin	20.2	425	449	475	30
5	all- <i>trans</i> - β -carotene	42.5	421	451	476	20
6	9- <i>cis</i> - β -carotene	44.2	423	445	472	28

Table 1: Assignment data for carotenoids in *Dunaliella tertiolecta*.

λ_{\max} : wavelengths of maximum absorption, % III/II: spectral fine structural value.

Members of the *Dunaliella* genera contain valuable carotenoid pigments such as α - and β -carotene, violaxanthin, neoxanthin, zeaxanthin and lutein (Tafreshi and Shariati, 2009). The absence of violaxanthin and the presence of the antheraxanthin and zeaxanthin in our *D. tertiolecta* extract can be explained by the xanthophyll cycle. Xanthophylls are essential for light-dependent growth. These molecules possess various functions in photosynthetic organisms, mainly the protection against photo-oxidative damage. When light absorption exceeds photochemical utilisation, the xanthophyll cycle in higher plants and green algae consists of the conversion of violaxanthin via a de-epoxidation reaction to form antheraxanthin and subsequently, zeaxanthin resulting in the accumulation of zeaxanthin. In darkness or when light absorption is no longer in excess, antheroxanthin is converted to violaxanthin through reverse epoxidation. Thus, the xanthophyll cycle is a dynamically regulated reversible interconversion of violaxanthin to antheraxanthin to zeaxanthin; it occurs in the thylakoid membrane of photosynthetic cells and plays a role in photoprotection (Long *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 2003). Formation of both antheraxanthin and zeaxanthin is closely associated with the use of continuous light in our experiments and the consequent irradiative stress in cells.

The carotenoids lutein and β -carotene were the major carotenoids accumulated under the assayed conditions. Under the test conditions, the highest amount of lutein, β -carotene and zeaxanthin attained in dry biomass were, respectively, $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$, $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$ and $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$, at 93 h of culture.

The statistical analysis shows that both salinity and temperature affected the amounts of lutein, zeaxanthin and β -carotene produced by *D. tertiolecta* (Table 2). Response surfaces for lutein (Figure 2a) and β -carotene (Figure 2b) show that salinity had a strong effect on these carotenoids. The highest β -carotene content occurred between 0.7 and 0.8 M NaCl. The effect of temperature on the amount of β -carotene was negligible. The highest lutein content occurred at a salinity range slightly higher, between 0.70 and 0.85 M NaCl. The increase in the cultivation temperature slightly increased the lutein content. The response surface for zeaxanthin (Figure 2c) shows that salinity and temperature had a strong effect on the amount of zeaxanthin. The highest zeaxanthin content occurred between 0.7 and 0.8 M NaCl and between 26 °C

and 28 °C, and the maximum point occurred at 0.756 M NaCl and 26.8 °C.

	Lutein ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Zeaxanthin ($\mu\text{g g}^{-1}$)		β -carotene ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Lipids (%)	
	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value
β_0	1310.554	0.0000	243.578	0.0000	631.860	0.0000	11.767	0.0000
β_T	-	-	-29.075	0.0336	-	-	0.8929	0.0040
β_T^2	-248.510	0.0172	-62.399	0.0089	-77.812	0.0881	-2.0071	0.0001
β_s	193.794	0.0013	35.275	0.0077	59.912	0.0474	-	-
β_s^2	-467.950	0.0001	-86.795	0.0006	-200.270	0.0002	-1.9194	0.0001
β_{Ts}	-	-	-	-	-	-	-	-
Regression								
<i>p</i> -value	< 0.0001		0.0011		0.0005		< 0.0001	
F	14.75		8.1		9.88		15.3	
<i>R</i> ²	0.735		0.682		0.622		0.754	
<i>LOF</i>	0.386		0.8644		0.1044		0.6867	

Table 2: Values of the regression coefficients of the coded variables and regression parameters for the amount of lutein, zeaxanthin, β -carotene and total lipids at 93 h of cultivation of *Dunaliella tertiolecta*. * *p*-value of lack of fit

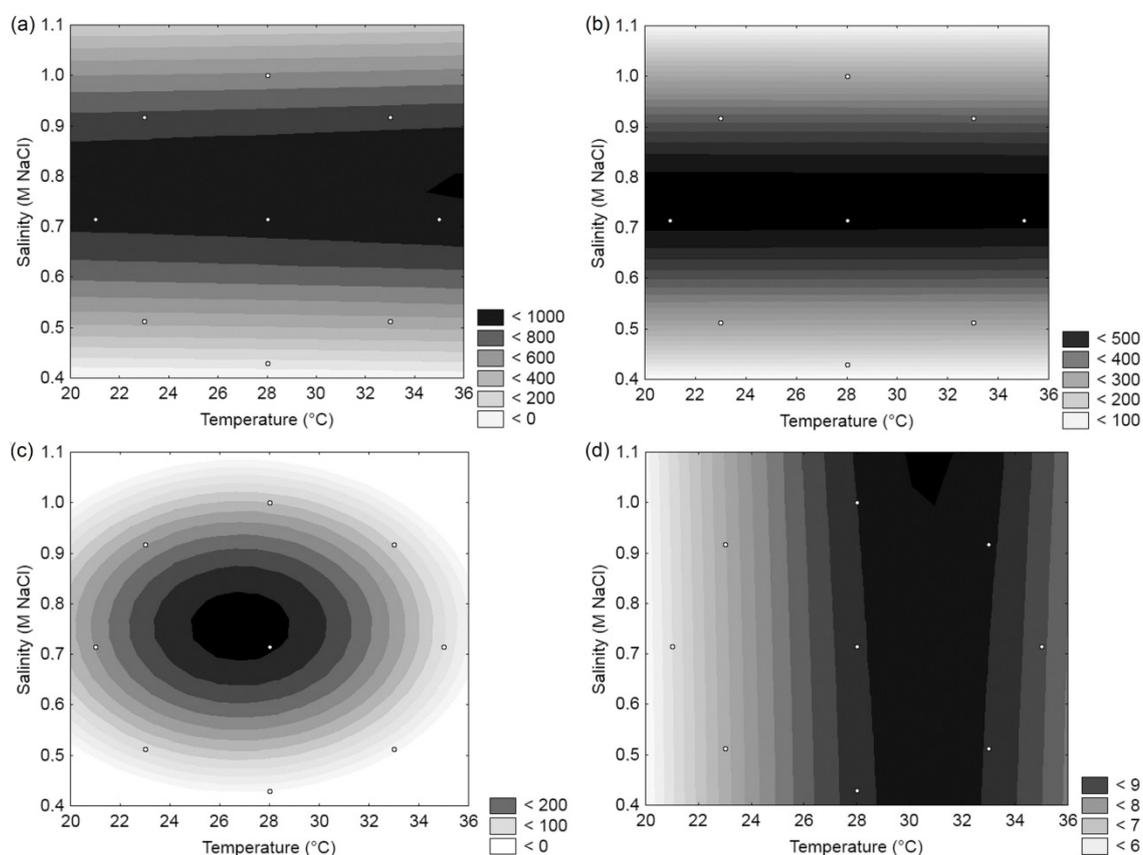


Figure 2: Response surfaces for the amounts of: (a) lutein ($\mu\text{g g}^{-1}$), (b) β -carotene ($\mu\text{g g}^{-1}$), (c) zeaxanthin ($\mu\text{g g}^{-1}$), (d) total lipids (%) at 93 h of culture as functions of the temperature and salinity.

There are studies that have investigated the production of β -carotene from *D. tertiolecta*, but few have examined the influence of physicochemical properties of the

medium on the production of lutein and zeaxanthin. Unlike the results of this work, *D. tertiolecta* DCCBC26 increased the total carotenoid content in the biomass when NaCl was increased from 0.5 M to 3 M (Fazeli *et al.*, 2006). Studies on *D. tertiolecta* CCAP 19/6B also showed that the lutein content in the biomass was about twice the β -carotene content (Barbosa *et al.*, 2005), similar to the results of this work.

Regarding the total lipid content in *D. tertiolecta*, temperature showed the strongest effect and the highest lipid content occurred at a temperature range between 28 °C and 32 °C. The increase in the medium salinity slightly increased the lipid content (Table 2, Figure 2d).

The highest experimental value of total lipid content (11.8 ± 1.8 %) was achieved in cultures performed at 28 °C and 0.715 M NaCl. In another work, *D. tertiolecta* SAG-13.86 presented a very similar lipid content (11.4 ± 1.8 %) (Sydney *et al.*, 2010). A review paper on the hydrothermal catalytic production of fuels and chemicals from aquatic biomass provides different lipid contents for different algae, ranging between 2 % and 22 % of dry matter, with a 6 % lipid content for *D. salina* (Becker, 2007).

Temperature and salinity showed no significant effect on *D. tertiolecta* elemental composition. Average values of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur content of all experiments were 41.19 ± 0.78 %, 3.48 ± 0.06 %, 1.55 ± 0.21 %, 0.36 ± 0.04 %, respectively. Shuping *et al.* (2010) found similar results for carbon (39 %), hydrogen (5.37 %) and nitrogen (1.99 %), while Sydney *et al.* (2010) found a carbon content of 36 %, both for *D. tertiolecta* biomasses.

4 | CONCLUSIONS

The experiments performed in this work showed that the physicochemical variables temperature and medium salinity strongly affected biomass composition during *D. tertiolecta* BE 003 growth. Temperature had a strong effect on the total lipid content, while medium salinity had a weaker effect on lipid content. However, medium salinity affected the concentration of the main carotenoids of *D. tertiolecta* biomass (lutein and β -carotene). Neither the temperature nor the salinity showed significant effect on *D. tertiolecta* elemental composition. These results show the importance of systematic studies on the effects of environmental factors on the microalgal growth parameters and biomass composition.

REFERENCES

- BARBOSA, M. J.; ZIJFFERS, J. W.; NISWORO, A.; VAES, W.; VAN SCHOONHOVEN, J.; WIJFFELS, R. H. **Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 2, p. 233-242, 2005.
- BAUDELET, P. H.; RICOCHON, G.; LINDER, M.; MUNIGLIA, L. **A new insight into cell walls of Chlorophyta.** *Algal Research*, v. 25, p. 333-371, 2017.
- BECKER, E. W. **Micro-algae as a source of protein.** *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.
- BENAVENTE-VALDÉS, J. R.; AGUILAR, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J. **Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species.** *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 117-125, 2016.
- CHAGAS, A. L.; RIOS, A. O.; JARENKOW, A.; MARCÍLIO, N. R.; AYUB, M. A. Z.; RECH, R. **Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation.** *Process Biochemistry*, v. 50, n. 6, p. 981-988, 2015.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. **HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9135-9141, 2007.
- DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. **Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta).** *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; DE CARVALHO, S. M.; FETT, R. **Microalgas, produtos e aplicações.** *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. **Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran.** *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2453-2456, 2006.
- FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. **Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 4144-4150, 2010.
- GUILLARD, R. L. **Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates.** In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975. chap. 3, p. 29-60.
- HU, C.; LIN, J.; LU, F.; CHOU, F.; YANG, D. **Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract.** *Food Chemistry*, v. 109, n. 2, p. 439-446, 2008.
- JAHNKE, L. S.; WHITE, A. L. **Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*.** *Journal of Plant Physiology*, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.
- JIN, E.; FETH, B.; MELIS, A. **A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 1, p. 115-124, 2003.
- KOCHEM, L. H.; DA FRÉ, N. C.; REDAELLI, C.; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. **Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger.** *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. **Photoinhibition of Photosynthesis in Nature.** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 45, p. 633-662, 1994.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, n. 1, p. 128-130, 1998.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. **Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.

SHUPING, Z.; YULONG, W.; MINGDE, Y.; KALEEM, I.; CHUN, L.; TONG, J. **Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake.** Energy, v. 35, n. 12, p. 5406-5411, 2010.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae.** Bioresource Technology, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, 2010.

TAFRESHI, A. H.; SHARIATI, M. ***Dunaliella* biotechnology: methods and applications.** Journal of Applied Microbiology, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. **Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*).** Food Chemistry, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

SOBRE O ORGANIZADOR

ALBERDAN SILVA SANTOS é Professor associado das faculdades de Química e Biotecnologia da UFPA; É Engenheiro Químico graduado pela UFPA; É Mestre em Química e Biotecnologia pelo Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL; É Doutor em Bioquímica (Biotransformações com ênfase em oxidações microbiológicas) pelo Instituto de Química da UFRJ. Realizou Estágio pós-doutoral no Departamento de Biotecnologia do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos - IATA de Valencia, na Espanha. Atua no ensino de graduação e Pós-graduação no qual orienta Mestrandos e Doutorandos. Coordena projetos de cunho acadêmico-científico nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular da UFPA, em áreas estratégicas como: Biotransformações; produção de enzimas; desenvolvimento de processos biotecnológicos no aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de biomoléculas de interesse médico, cosméticas e farmacêutica; produção de biomoléculas a partir de cultivo de micro-organismos e cultivo de células vegetais. Aplica técnicas avançadas de Metabolômica e Lipidômica (CG/EM, LC/MS) na investigação metabólica de plantas e micro-organismos. Contribuiu na criação do curso de graduação e do programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFPA. Foi o 1º Diretor da Faculdade de Biotecnologia da UFPA no período de 2009-2011. Atuou como vice-coordenador protempore do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFPA. Possui diversas publicações nas áreas da Química e Biotecnologia, assim como patentes. Recebeu a primeira Carta Patente na UFPA em dezembro de 2013. É pioneiro na otimização de processo de produção de metabólitos secundários e enzimas em cultura de células vegetais e de micro-organismos na Região Norte do Brasil.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-47-5

