



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS



PEDRO RENANN LOPES DE FRANÇA

ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO EM
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Garanhuns

2018

PEDRO RENANN LOPES DE FRANÇA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO EM
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

Relatório apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns em cumprimento às exigências para a aprovação na disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Prof. Dra. Tatiana Souza Porto

Supervisor (a): Prof. Dra. Tatiana Souza Porto

Garanhuns

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

F814e França, Pedro Renann Lopes de

Estágio supervisionado obrigatório em biotecnologia industrial
/ Pedro Renann Lopes de França. - 2018.
38 f: il.

Orientador(a): Tatiana Souza Porto.
Trabalho de ESO (Estágio Supervisionado Obrigatório :
Curso de Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Engenharia de
Alimentos, Garanhuns, BR - PE, 2018.
Inclui referências

1. Poligalacturonase 2. Biotecnologia 3. Enzimas
4 Fermentação I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Título.

CDD 664.07

Pedro Renann Lopes de França

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO EM
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

APROVADO:

Dra. Tatiana Souza Porto (Orientadora e Supervisora)
Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE

Dr. André Felipe de Melo Sales Santos (Examinador)
Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE

Marcia Nieves Carneiro da Cunha (Examinadora)
Pós-Doutorado-PNPD/CAPES: Biociência Animal – UFRPE

FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
OBRIGATÓRIO

SUPERVISOR (A): Prof^a Dra. Tatiana Souza Porto

AGRADECIMENTOS

Pensei em fazer algo poético aqui, mas gastei toda minha criatividade nos agradecimentos da monografia, porém, não será o meu bloqueio criativo que me impedirá de expressar o quão grato estou, a todos que aqui mencionarei, por fazerem parte dessa jornada que perpetuou-se ao longo destes últimos cinco anos, e que agora é findada com este trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus por guiar-me até aqui, iluminando meu caminho e me fortalecendo quando mais precisava. E a minha família, por todo o apoio que me deu principalmente minha mãe, Creuza.

Agradeço a minha orientadora/supervisora, Tatiana Porto, que me acompanhou em grande parte dessa jornada me orientando nos diversos trabalhos que desenvolvemos, que você continue inspirando pessoas e profissionais como me inspirou.

Aos membros do CENLAG, principalmente os que compõem o grupo de pesquisa da minha orientadora, agradeço todo o apoio no desenvolvimento das atividades deste e de outros trabalhos. Especialmente, a Jônatas Carvalho meu fiel companheiro científico, espero que nossa parceria e amizade se perpetue por muitos anos.

Agradeço ao corpo docente de Engenharia de Alimentos da UFRPE/PE por todo o conhecimento que compartilharam comigo, contribuindo para minha formação. Que continuem este lindo trabalho, formando grandes profissionais para o mundo.

Não deixaria de fora a minha turma, que foram os melhores companheiros de jornada que pude ter, vocês foram essenciais para mim nestes últimos anos e os guardarei comigo para sempre. Especialmente o meu *cluster* (Marcos, Avla e Giovanna) pelos trabalhos que fizemos e besteiróis que conversamos ao longo dos 10 períodos que agora estamos concluindo.

RESUMO

A poligalacturonase (PG) é uma enzima pectinolítica que catalisa a reação de degradação da pectina, um carboidrato presente nos tecidos vegetais e que confere rigidez a estes. Esta enzima corresponde a pectinase de maior interesse comercial sendo amplamente utilizada na indústria de processamento de sucos de frutas. Durante o processo fermentativo de produção destas enzimas torna-se imprescindível a análise cinética, uma vez que está fornece dados necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva, ficando evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial. Baseado nisto, as atividades desenvolvidas durante o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) visaram determinar os parâmetros cinéticos de fermentação para produção de PG de *Aspergillus aculeatus* URM 4953 em fermentação submersa, realizada em biorreator em escala laboratorial operado em batelada. As atividades foram realizadas no Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG), no âmbito do laboratório de Biotecnologia. O meio fermentativo foi preparado com a farinha da casca do maracujá. A fermentação que foi conduzida por 137 horas, apresentou crescimento exponencial de biomassa no intervalo de 19 a 68 horas e atingiu velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) de $0,0125 \text{ h}^{-1}$. A produção de PG apresentou máxima atividade ($1,02 \text{ U/mL}$) após 88h durante a fase de morte celular. Entretanto, sua atividade específica máxima ($55,77 \text{ U/mg}$) foi observada após 65 h de fermentação. Os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) e substrato em produto ($Y_{p/s}$) foram $0,73 \text{ g}_x/\text{g}_s$, e $0,22 \text{ U/mg}_s$, respectivamente, enquanto que o fator de recuperação de biomassa em produto ($Y_{x/p}$) foi de 0.37 U/mg_x . As atividades desenvolvidas transcorreram conforme cronograma descrito previamente no projeto sem grandes empecilhos. Durante a realização do estágio, foram aprimorados o manuseio do biorreator automatizado, teoria sobre balanços de massa das diferentes formas de operações e desenvolvimento das relações interpessoais. As dificuldades encontradas foram, em sua totalidade, superadas pelo aprendizado e troca de experiências com profissionais da área, que atuam no CENLAG.

Palavras-chaves: Poligalacturonase, *Aspergillus aculeatus*, Cinética de fermentação, Biorreator, Biotecnologia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Classificação das pectinases de acordo com o substrato específico e mecanismo de atuação na molécula de pectina.13
- Figura 2.** *Layout* parcial do Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG), com representação da área sul do prédio, onde foram desenvolvidas as atividades do ESO. (A) Representação em 2D. (B) Representação em diferentes perspectivas.....18
- Figura 3.** Principais equipamentos utilizados nas atividades realizadas no ESO.....19
- Figura 4.** Fluxograma das atividades desenvolvidas durante Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO)24
- Figura 5.** Resíduo obtido da secagem, trituração e padronização (<0,5 mm) da casca de maracujás e utilizado na fermentação submersa (FS) em biorreator para a produção de PG do *Aspergillus aculeatus* URM 495325
- Figura 6:** Câmara de Neubauer utilizada para a contagem de esporos presentes na suspensão de esporos do *Aspergillus aculeatus* URM 495326
- Figura 7:** Meio fermentativo elaborado a partir do resíduo de casca maracujá e utilizado para a obtenção de PG do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 por fermentação submersa (FS) em batelada em biorreator.27
- Figura 8.** Biorreator utilizado para fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953.28
- Figura 9.** Imagem do supervisório utilizado pelo sistema de controle de processos fermentativos realizados no biorreator Tecnal BIOTEC-C.29
- Figura 10.** Evolução nas concentrações de biomassa, pectina e atividade da PG durante o processo de fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.32
- Figura 11.** Gráfico LnX versus Tempo de fermentação plotado durante a etapa de crescimento exponencial, para determinação da velocidade máxima de crescimento de biomassa (μ_{max}) da fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.33
- Figura 12.** Biomassa fúngica formada no término da fermentação (137h) fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator. ...34

Figura 13. Evolução da atividade específica da PG ao longo do processo de fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator. ...34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cronograma do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado no laboratório de biotecnologia do Centro Laboratorial de Apoio à pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG).16

Tabela 2. Fatores de conversão obtidos na análise cinética do processo fermentativo para a produção da PG de *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.34

LISTA DE SÍMBOLOS

PG – Poligalacturonase

FS – Fermentação submersa

A – Taxa de acúmulo

E – Taxa de entrada

S – Taxa de saída

R – Taxa de reação

S – Concentração de substrato

V – Volume

t – Tempo

r_s – Velocidade volumétrica de consumo de substrato

r_x – Velocidade volumétrica de formação de biomassa

μ_{max} – Velocidade máxima de formação de biomassa

r_p – Velocidade volumétrica de formação de produtos

q_s – Velocidade específica de consumo de substrato

μ_x – Velocidade específica de formação de biomassa

q_p – Velocidade específica de formação de produtos

P_r – Concentração de produtos

$Y_{x/s}$ – Fator de conversão de substrato em biomassa

$Y_{x/p}$ – Fator de conversão de biomassa em produto

$Y_{p/s}$ – Fator de conversão de substrato em produto

C – Concentração de esporos

P – Peso do papel filtro

v – razão entre o volume de substrato pelo volume de extrato enzimático

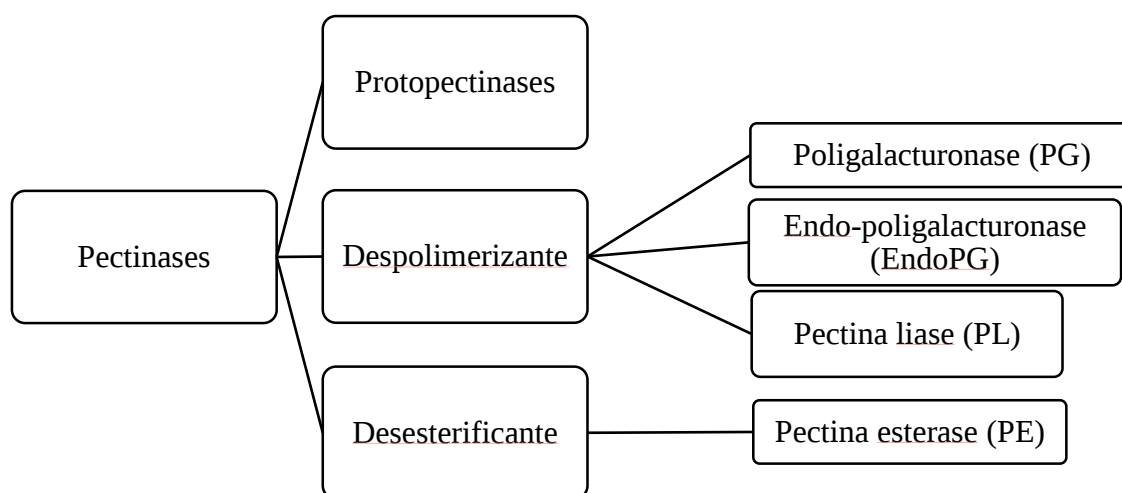
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO	16
3. DESCRIÇÃO DA UNIDADE CONCEDENTE	16
4. TEORIA	20
5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	24
3.1. Obtenção, limpeza e secagem do substrato.....	24
3.2. Preparação do inóculo	25
3.2.1. Micro-organismo	25
3.2.2. Contagem de esporos.....	26
3.3. Produção de pectinases por fermentação submersa em biorreator	26
3.4. Determinação da concentração de pectina	30
3.5. Atividade enzimática da PG.....	30
3.6. Proteína total	31
6. RESULTADOS.....	32
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas que possuem o potencial de degradação das substâncias pécticas, que consistem em carboidratos presentes na lamela média das paredes celulares primárias dos tecidos vegetais conferindo rigidez a estes (MARTOS et al., 2014). Estas enzimas podem ser divididas em 3 grupos conforme seu mecanismo de atuação na molécula de pectina (Figura 1): as desesterificantes ou desmetoxilantes que catalisam a hidrólise dos grupos metil da pectina (HABRYLO et al., 2018); as protopectinases, as quais atuam na protopectina, naturalmente é insolúvel, tornando-a solúvel (UENOJO; PASTORE, 2007) e as despolimerizantes que atuam ao longo da cadeia polimérica da pectina por dois mecanismos distintos, clivando as ligações glicosídicas α -1,4 (hidrolases) ou catalizando a despolimerização por β -eliminação (liases ou transeliminases)(KASHYAP et al., 2001). Dentre as pectinases, as poligalacturonases (PG) são as enzimas de maior interesse comercial, devido a sua atuação na principal cadeia da pectina (OZUNA; BARRO, 2017).

Figura 1. Classificação das pectinases de acordo com o substrato específico e mecanismo de atuação na molécula de pectina.



Fonte: o autor.

As preparações enzimáticas pectinolíticas são de grande importância comercial representando cerca de um quarto de toda a produção mundial de enzimas alimentares e 20% do total de enzimas de uso industrial. Nestas, as pectinases fúngicas se destacam, estando entre as mais importantes enzimas comerciais com amplas aplicações (GOMES et al., 2011; HABRYLO et al., 2018)

A indústria de alimentos tem sido a principal consumidora de enzimas pectinolíticas, dando-se destaque a indústria de processamento de sucos, pois o uso destas proporciona a redução do tempo de muitas operações, como a filtração, maior rendimento e clareamento do volume processado, além de conferir maior estabilidade ao produto concentrado. Outras aplicações incluem: a maceração de produtos hortícolas, para a extração de óleos e pigmentos; tratamento de fibras naturais, para o uso da indústria têxtil e de papel; podendo ainda, serem aplicadas na indústria de vinhos (ANDRADE et al., 2009; SOUZA et al., 2010; TEIXEIRA; FILHO; DURÁN, 2000).

Na natureza os micro-organismos secretam uma série de enzimas para degradar as substâncias não celulósicas da planta. A produção industrial de enzimas pectinolíticas é feita principalmente por fungos filamentosos (WONG et al., 2017), como os do gênero *Aspergillus*, que destacam-se por apresentarem altas atividades do complexo pectinolítico (SANDRI; FONTANA; MOURA, 2015). Diversos estudos utilizaram inúmeras linhagens pertencentes a este gênero: *Aspergillus sojae* (DEMIR; TARI, 2014), *Aspergillus flavus* (ANAND; YADAV; YADAV, 2017), *Aspergillus awamori* (ANURADHA et al., 2014) *Aspergillus carbonarius* (NAKKEERAN et al., 2012), *Aspergillus oryzae* (FONTANA; SILVEIRA, 2012) *Aspergillus niger* (GOMES et al., 2011). No entanto, a produção de pectinases foi limitada a algumas linhagens de micro-organismos, bem como, o estudo do processo produtivo de suas moléculas, sendo assim, a pesquisa em torno disso é impulsionada (WONG et al., 2017).

O *Aspergillus aculeatus* tem-se destacado com um bom produtor de diferentes enzimas como: frutossiltransferase (GHAZI et al., 2007), β -1,4-galactanase (TORPENHOLT et al., 2015), xilanase (DAS; RAY, 2016), β -fructofuranosidase (LORENZONI et al., 2014), endoglucanase (TAKADA et al., 2002), dentre outras. Apesar de atualmente no Brasil existir preparos pectinolíticos de *A. aculeatus* comercializados, como a Pectinex Ultra SP-L (Sigma) (OLIVEIRA et al., 2018), o relato pela literatura ainda é pobre.

Os metabolitos oriundos de micro-organismos aeróbios, como o fungo filamentoso *A. aculeatus*, são quase invariavelmente produzidos utilizando biorreatores de tanques agitados e aerados, os quais já possuem sua utilização bem estabelecida, e com sucesso, em fermentações industriais (PATEL et al., 2018). A produção de pectinases microbianas pode ser realizada por dois processos distintos denominados fermentação submersa – FS (no qual o meio é completamente líquido) e fermentação em estado sólido – FES (neste o meio é majoritariamente sólido, com uma umidade relativamente baixa).

O cultivo submerso tem sido mais aplicada industrialmente, cerca de 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por esta técnica, devido as inúmeras vantagens que este apresenta sobre o cultivo em estado sólido (SANDRI; FONTANA; MOURA, 2015). As principais vantagens da FS compreendem, a capacidade aumento de escala de produção e controle de parâmetros do processo, como pH, temperatura, transferência de oxigênio e umidade (UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2015). Além disto, há uma maior variedade de biorreatores, a nível industrial, que operam utilizando a FS. Enquanto, referente a este aspecto utilização da FES tem se mostrado mais restrita (LOPEZ-RAMIREZ et al., 2018). Apesar disto, a FES também apresenta aspectos positivos, tais como: capacidade de aproximar o ambiente de crescimento natural dos fungos filamentosos, o que torna mais fácil de controlar e conservar o ciclo morfológico; maior produtividade dos extratos brutos enzimáticos; enzimas mais estáveis em relação à temperatura e pH, bem como, menor suscetibilidade à inibição; além de, possibilita um melhor reaproveitamento de resíduos gerados em processos agroindustriais como substrato de crescimento do fungo (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

A inclusão de resíduos agroindustriais na produção das pectinases para uso industriais tem se mostrado bastante promissor, pois são compostos principalmente de carboidratos complexos e proteínas que podem servir como nutrientes para o crescimento microbiano e produção de enzimas. Podendo, ser incluídos inúmeros resíduos agroindustriais como: casca de manga, casca de uva, miolo de tamarindo, casca de sapoti, casca de banana, bagaço de maçã, casca de mamão, bagaço de amendoim, bagaço de dendê, casca de romã, farelo de arroz e farelo de trigo (POONDLA et al., 2016). Esses resíduos tem despertado elevado interesse econômico, especialmente no Brasil que possui em abundância resíduos agroindustriais (CASTRO et al., 2015). Além disso, a disposição inadequada destes resíduos apresenta um grande impacto ambiental, assim, sua utilização em processos fermentativos reduz tais efeitos, agregando ainda mais valor ao processo (LÓPEZ et al., 2018).

Nestes processos fermentativos a análise cinética apresenta grande valia, pois, os parâmetros nela obtidos representam o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação, como por exemplo, a identificação da duração do processo, geralmente baseada no instante em que a concentração de biomassa e produtos de interesse apresentam valores máximos, uma vez que, esses valores representam parte de um conjunto de dados, necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva, fica evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um

experimento de laboratório para a escala industrial (*sacale-up*). Além desse aspecto, cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis obtidas (SCHMIDELL et al., 2001)

Diante disto, o objetivo do trabalho foi realizar a produção de poligalacturonase utilizando *A. aculeatus* URM 4953 em biorreator em escala laboratorial por fermentação submersa operando em batelada, bem como, avaliar a cinética do processo fermentativo.

2. LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no laboratório de biotecnologia do Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa (CENLAG) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), vinculado a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), presente no município de Garanhuns-PE.

As atividades do estágio ocorreram no período de 01/10/2018 a 13/12/2018, integralizando 300 horas, com carga horária de 6 horas diárias (07:30 – 13:30h) por 50 dias úteis, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Cronograma do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado no laboratório de biotecnologia do Centro Laboratorial de Apoio à pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG).

MESES	PERÍODO	HORAS SEMANAIS
Outubro	01-05/10	30
	08-11/10	24
	15-19/10	30
	22-26/10	30
	29-31/10	18
Novembro	01/11	6
	05-09/11	30
	12-14/11	18
	19-23/11	30
	26-30/11	30
Dezembro	03-07/12	30
	10-13/12	24
		Total de horas: 300 h

3. DESCRIÇÃO DA UNIDADE CONCEDENTE

Criada em 1912, a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) era conhecida como a Escola Superior de Agricultura e Medicina Veterinária. Contudo,

somente em 1955, foi federalizada e recebeu a sua denominação hoje usada. Sua história secular é marcada, ao mesmo tempo, pela capacidade de inovação ao buscar contribuir com a superação dos problemas socioambientais e o desenvolvimento sustentável em projetos e pesquisas que envolvem as ciências tecnológicas, agrárias, humanas, sociais e exatas. Inaugurada com os cursos de Medicina Veterinária e Agronomia, o novo perfil da Instituição abrange 55 cursos de graduação, distribuídos entre o campus do Recife e nas Unidades Acadêmicas de Garanhuns (UAG), de Serra Talhada (UAST) e do Cabo de Santo Agostinho (UACSA), além de Educação a Distância (UFRPE, 2018).

Objetivando a difusão de conhecimento para outras regiões, iniciou-se a expansão do sistema federal de ensino superior, tendo a Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da UFRPE como a primeira extensão universitária a ser instalada no país, suas atividades foram iniciadas no segundo semestre de 2005, com os cursos de Agronomia, Ciência da Computação, Engenharia de Alimentos, Licenciatura em Letras, Licenciatura em Pedagogia, Medicina Veterinária e Zootecnia. Os mesmos encontrados até então na instituição (UAG/UFRPE, 2018).

No processo de consolidação da UAG como referência de ensino, pesquisa e extensão, foi fundado em 2009, o Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) a partir de recursos advindos do Ministério de Ciência e Tecnologia. Durante sua idealização e instalação, foram firmados os seguintes objetivos:

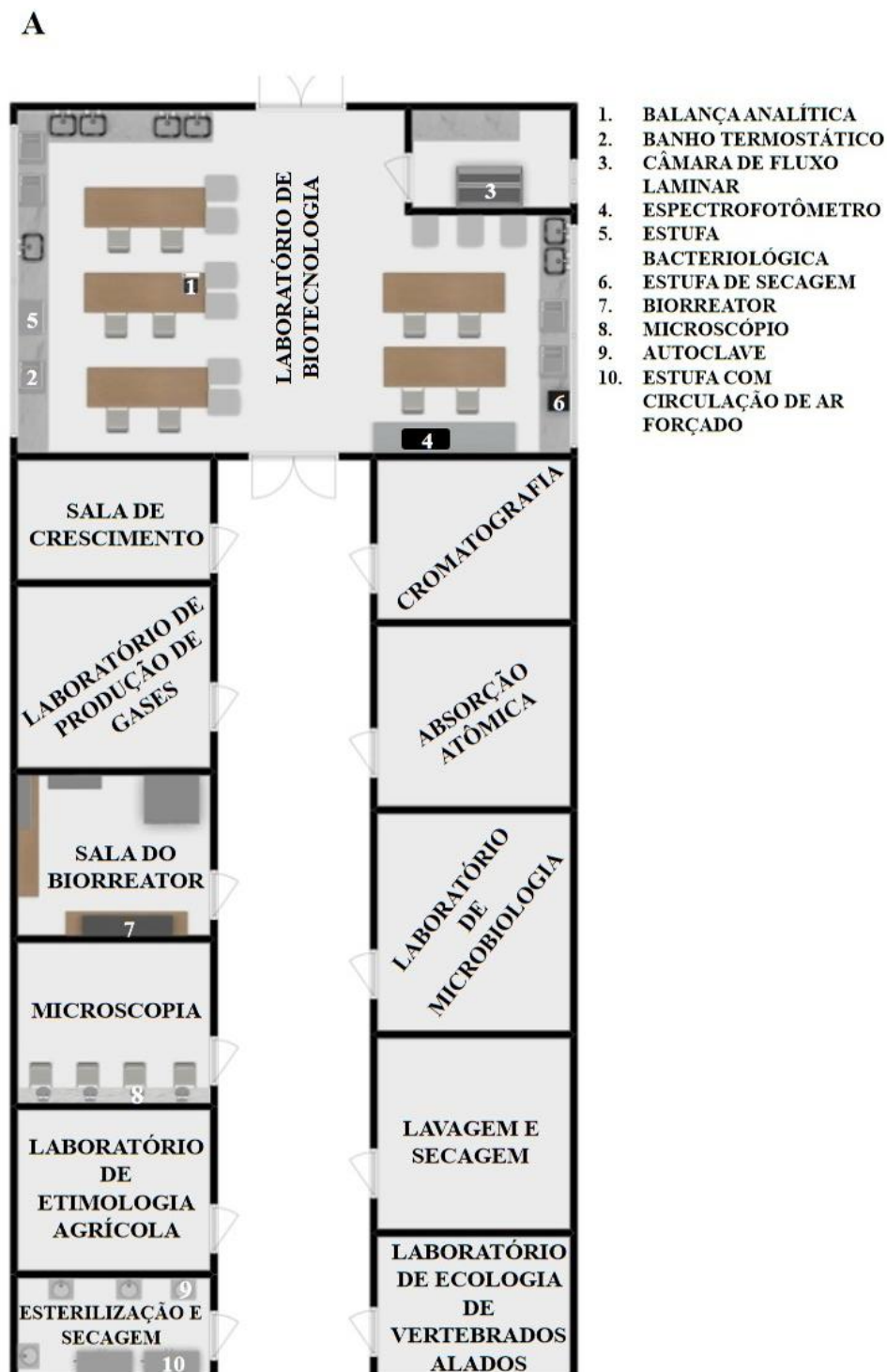
- Desenvolver tecnologias, produtos e processos de interesse de seus usuários;
- Apoiar projetos de pesquisa, desenvolvimento e inovação aprovados por agência de fomento, ou não, desde que haja recursos disponíveis para execução do projeto;
- Gerar competência científica no desenvolvimento e no aprimoramento de técnicas e produtos;
- Dar suporte aos laboratórios locais ou descentralizados.

Estruturalmente o CENLAG é composto pelos laboratórios multiusuários de Biologia Molecular, Espectrometria de Absorção Atômica, Fitossanidade, Geoprocessamento, Microscopia, Microbiologia, Nutrição de plantas, Produção vegetal, Biotecnologia e salas anexas. Sendo, o último laboratório citado o ponto central do ESO.

A Figura 2 apresenta um layout parcial do CENLAG, representando o laboratório de biotecnologia e algumas salas anexas (sala do biorreator, esterilização e secagem e

microscopia) utilizadas no desenvolvimento das atividades. Nesta, na Figura 1A tem-se a representação 2D, na qual, pode-se observar um conjunto de instalações que formam o laboratório, enquanto que, na Figura 1B há a representação do mesmo esquema em diferentes perspectivas.

Figura 2. Layout parcial do Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG), com representação da área sul do prédio, onde foram desenvolvidas as atividades do ESO. (A) Representação em 2D. (B) Representação em diferentes perspectivas.



B

Fonte: o autor.

O laboratório de biotecnologia é dividido entre quatro professores/pesquisadores da UAG/UFRPE, que atuam no desenvolvimento de projetos de pesquisas tanto da graduação (monitoria, iniciação científica e extensão) e pós-graduação (mestrado e doutorado), sendo eles: Renato Molica, Keila Moreira, Erika Valente e Tatiana Porto (Orientadora/supervisora do ESO). A estrutura presente neste laboratório permitiu a realizar a produção de PG de *A. aculeatus* URM 4953 em biorreator por FS em batelada, bem como, avaliar a cinética do processo fermentativo com êxito.

A Figura 3 apresentam os principais equipamentos utilizados nas atividades do ESO.

Figura 3. Principias equipamentos utilizados nas atividades realizadas no ESO.



Agitador Magnético
Marca: Fusatom
Modelo: 752A



Autoclave Vertical
Marca: Phoenix
Modelo: AV-50



Balança Analítica
Marca: Shimadzu
Modelo: AUY220



Banho Termostático
Marca: Tecnal
Modelo: TE - 0541



Biorreator
Marca: Tecnal
Modelo: BIOTEC-C



Câmara de Fluxo Laminar
Marca: Pacharne
Modelo: PA-400



Espectrofotômetro UV-VIS
Marca: Spectrum
Modelo: SP-1105



Estufa Bacteriológica
Marca: OdontoBras
Modelo: ECB-1.3



Estufa c/ Circulação de Ar Forçado
Marca: Tecnal
Modelo: TE -393/2



Estufa de Secagem
Marca: Químio
Modelo: Q317M-32



Microscópio ótico
Marca: Zeiss
Modelo: Primo Star Package



Moinho de Facas
Marca: SPLabor
Modelo: MA-340

Fonte: o autor.

4. TEORIA

Os biorreatores podem ser operados em diferentes formas de processos fermentativos, sendo eles, batelada, contínua e descontínua alimentada. As atividades

desenvolvidas ao longo do ESO, utilizaram um biorreator para a realização de uma fermentação em batelada, logo, a análise teórica irá se deter a este tipo de processo.

Segundo Schmidell et al., (2001), a equação geral de transformação nestes sistemas pode ser descrita de acordo com a Lei de conservação de massa (Equação 1).

$$A = E - S \pm R \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, A é a taxa de acúmulo, E a taxa de entrada, S a taxa de saída e R representa a taxa de reação no interior do biorreator, podendo ser de geração ou consumo.

Na fermentação em batelada o sistema se encontra fechado, pois, não é alimentado, nem mesmo o caldo fermentado é retirado. Logo a Equação 1 resume-se em:

$$A = \pm R \quad (\text{Eq. 2})$$

Assim, os balanços de massa podem ser deduzidos para biomassa, substrato e produtos durante este processo fermentativo:

- **Consumo de substrato**

Com o passar do tempo, a concentração de substrato irá diminuir ($-R$) e, portanto, esta concentração pode ser descrita como uma variação da massa de substrato em função do tempo. Sabendo-se que a massa é produto da concentração e volume, tem-se:

$$A = \frac{d(S.V)}{dt} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, S é a concentração de substrato, V o volume do meio fermentativo e t o tempo. Da mesma forma, o consumo de substrato apresenta uma velocidade (r_s) para o mesmo volume de meio fermentativo (Equação 4).

$$-R = r_s \cdot V \quad (\text{Eq. 4})$$

Substituindo as Equações 3 e 4 na Equação 2 e considerando que o volume do meio fermentativo permaneça o mesmo ao longo do processo ou que apresente uma variação desprezível, tem-se:

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (\text{Eq. 5})$$

- **Formação de biomassa**

Ao longo da fermentação a concentração de biomassa aumentará e de maneira análoga, as deduções utilizadas para o consumo de substrato tem-se:

$$\frac{dX}{dt} = -\mu_x \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, X é a concentração de biomassa, t o tempo e r_x a velocidade de formação de biomassa.

Pela integração da equação 12, tem-se:

$$\ln\left(\frac{X_t}{X_0}\right) = r_x \cdot t \quad (\text{Eq. 7})$$

Na fase exponencial a velocidade específica de crescimento é constante, assim o ângulo da reta tangente a esta curva representará a velocidade máxima de crescimento da biomassa ($\mu_{\max}$).

$$\ln\left(\frac{X_t}{X_0}\right) = \mu_{\max} \cdot t \quad (\text{Eq. 8})$$

- **Formação de produtos**

Seguindo o mesmo raciocínio, a formação de produtos pode ser descrita pela Equação 7.

$$\frac{dPr}{dt} = -r_p \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde, Pr é a concentração de produtos, t o tempo e r_p a velocidade de formação de produtos.

As velocidades descritas nas Equações 5, 6 e 9 são denominadas velocidades volumétricas de transformação. Entretanto, como é de conhecimento, durante o crescimento da biomassa microbiana diferentes fases podem ser observadas e, portanto, essas velocidades quando baseadas na concentração de biomassa em um dado momento podem fornecer uma melhor representatividade do sistema:

$$r_s = q_s \cdot X \quad (\text{Eq. 10})$$

$$r_x = \mu_x \cdot X \quad (\text{Eq. 11})$$

$$r_p = q_p \cdot X \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde, q_s , μ_x e q_p são as velocidades específicas de transformação, para o substrato, biomassa e produto, respectivamente.

Substituindo-se as Equações 10, 11 e 12 nas Equações 5, 6 e 9, tem-se:

$$q_s = \frac{dS}{Xdt} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$\mu_x = \frac{dX}{Xdt} \quad (\text{Eq. 14})$$

$$q_p = \frac{dP}{Xdt} \quad (\text{Eq. 15})$$

Como o crescimento microbiano apresenta diferentes fases, a concentração de biomassa microbiana depende da fase em que o sistema se encontra:

- Fase lag – fase de adaptação do M.O ao meio;
- Fase exponencial – nesta a velocidade de crescimento é constante e máxima;
- Fases estacionária – fase em que a velocidade de crescimento é constante e há um equilíbrio de crescimento e morte celular;
- Fase de decaimento – fase em que o substrato se encontra escasso e a velocidade de morte é maior que a de crescimento.

Geralmente, a formação de produtos não está diretamente atrelada a concentração de biomassa, pois o micro-organismo pode consumir o substrato apenas para o crescimento e/ou manutenção de funções vitais sem a formação de produtos.

Deste modo, outros parâmetros se tornam de grande importância no controle de um processo fermentativo. Esses parâmetros são conhecidos como fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$), de biomassa em produto ($Y_{x/p}$) e de substrato em produto ($Y_{p/s}$). Estes são obtidos pela razão das velocidades específicas de transformação (Equações 14,15 e 16).

$$Y_{x/s} = \frac{\mu_x}{q_s} \quad (\text{Eq. 16})$$

$$Y_{x/p} = \frac{\mu_x}{q_e} \quad (\text{Eq. 17})$$

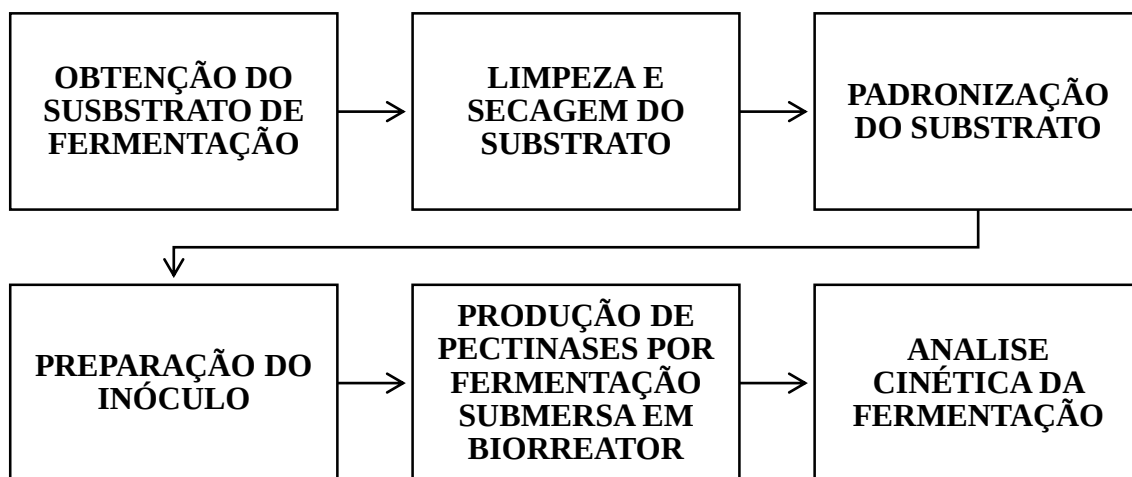
$$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} \quad (\text{Eq. 18})$$

Todos estes parâmetros toram-se de extrema importância para estudos cinéticos de processos fermentativos.

5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas durante o ESO serão apresentadas em forma de metodologias e resultados, uma vez que, consistiram em experimentos laboratoriais visando a produção de PG de *A. aculeatus* URM4953 por FS em biorreator em escala laboratorial (com um volume de 1,20 L) por processo em batelada. Assim, a Figura 4 apresenta o fluxograma das atividades realizadas ao longo do estágio ESO.

Figura 4. Fluxograma das atividades desenvolvidas durante Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).



Fonte: o autor.

3.1. Obtenção, limpeza e secagem do substrato

Os maracujás (*Passiflora edulis*) utilizados para a elaboração do substrato de fermentação foram adquiridos no comércio local (Garanhuns – PE). Estes, foram limpos pela remoção das sujidades visíveis, a partir, da lavagem em água corrente. Assim, foram despulpados e as cascas foram trituradas em processador doméstico para aumentar a superfície de contato. E então, as cascas trituradas foram secas em estufa de circulação de ar forçado de bandejas a uma temperatura de 60° C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), durante 48h.

O resíduo seco foi triturado em moinho de facas, o qual possui acoplado em seu sistema uma peneira de 0,5 mm (9 Mesh). A farinha foi armazenada em recipientes de polietileno e utilizada na realização da fermentação (Figura 5).

Figura 5. Resíduo obtido da secagem, trituração e padronização (<0,5 mm) da casca de maracujás e utilizado na fermentação submersa (FS) em biorreator para a produção de PG do *Aspergillus aculeatus* URM 4953.



Fonte: o autor.

3.2. Preparação do inóculo

3.2.1. Micro-organismo

O fungo utilizado nos experimentos foi *A. aculeatus* URM 4953 cedido pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, preservado em óleo mineral. Este, é um fungo filamentoso de cor preta e alta esporulação em condições normais de cultivo. O fungo foi reativado em solução nutritiva (10g de peptona, 3g de extrato de levedura e 20g de glicose para 100mL de água destilada) e repicado em Erlenmeyers de 125 mL contendo meio Czapek previamente estéril (121°C/20 min) em autoclave vertical. A esporulação foi padronizada em sete dias, onde o repique foi mantido em estufa microbiológica à 30°C.

3.2.2. Contagem de esporos

Uma suspensão de esporos foi produzida a partir da adição de 20 mL de solução salina estéril (0,9% de NaCl e 0,01% de Tween 80) em um Erlenmeyer contendo o fungo esporulado, sob agitação em agitador magnético. A suspensão foi transferida para um Erlenmeyer estéril vazio e uma alíquota de 15µL foi retirada para contagem de esporos mediante câmara de Neubauer (Figura 6) em microscópio. Os cinco quadrantes da malha da câmara (marcados em vermelho) foram contados, em seguida foram somados os valores de cada quadrante e multiplicado por 5 e pelo fator de diluição da câmara (10^4) de modo a obter a concentração de esporos da suspensão analisada. O volume final de solução de esporos necessário para a inoculação é calculado mediante a Equação 19, para uma concentração final de 10^3 esporos/mL no meio de fermentação.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (19)$$

Onde, C_1 e V_1 são a concentração inicial e volume inicial, respectivamente, e C_2 e V_2 a concentração final e volume final, respectivamente.

Figura 6: Câmara de Neubauer utilizada para a contagem de esporos presentes na suspensão de esporos do *Aspergillus aculeatus* URM 4953.



Fonte: o autor

3.3. Produção de pectinases por fermentação submersa em biorreator

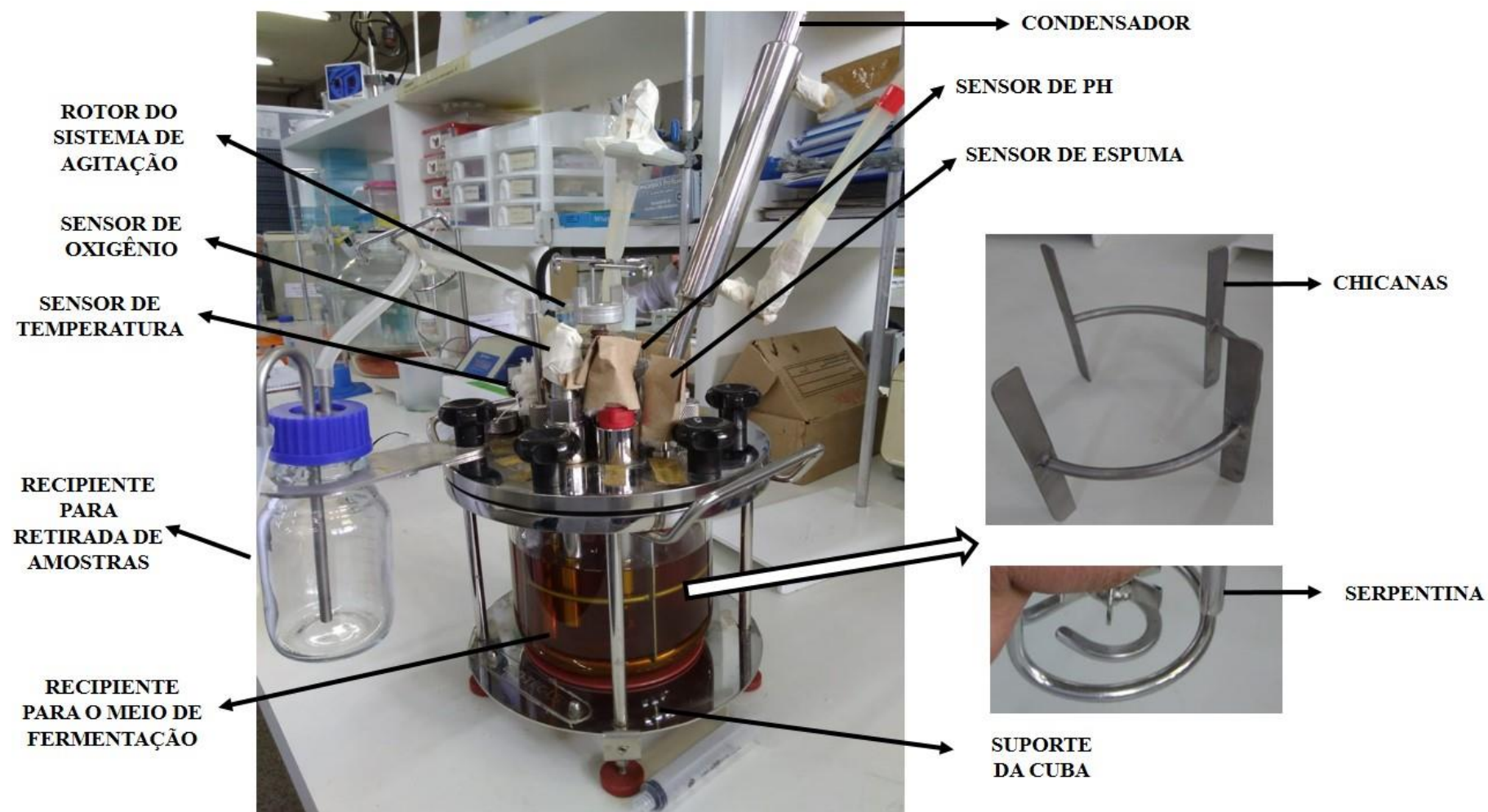
O meio fermentativo foi preparado segundo Fontana, Polidoro e Silveira (2009), formando uma suspensão em água destilada contendo 3% da farinha da casca de maracujá (item 3.1). Para a extração da pectina presente na farinha, esta suspensão foi autoclavada a 121°C por 20 min. Posteriormente, a mistura foi filtrada, para a remoção de partículas suspensas, e acrescida de outros nutrientes, correspondendo aos seguintes sais: 0,01% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,02% de K_2HPO_4 ; e 1% de extrato de levedura (Figura 7). O meio finalizado foi colocado na cuba do biorreator, contabilizando um total de 800 mL, e esta foi montada com todos acessórios necessários (Figura 8), e então o conjunto foi levado à autoclave para esterilização, nas condições já mencionadas.

Figura 7: Meio fermentativo elaborado a partir do resíduo de casca maracujá e utilizado para a obtenção de PG do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 por fermentação submersa (FS) em batelada em biorreator.



Fonte: o autor.

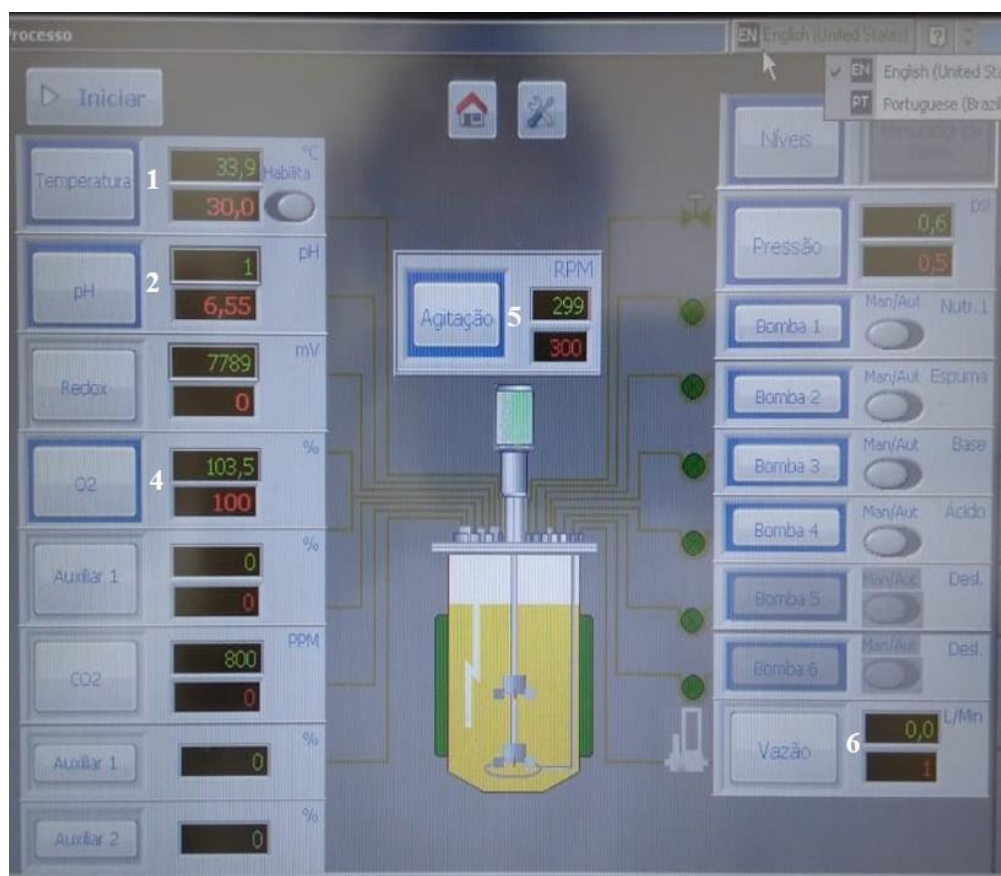
Figura 8. Biorreator utilizado para fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953.



Fonte: o autor

O biorreator foi conectado ao controlador finalizando, assim, a montagem (como representado na Figura 2). Este, possui um programa computacional supervisório que foi utilizado para o controle da fermentação (Figura 9), que permite o controle das variáveis deste processo.

Figura 9. Imagem do supervisório utilizado pelo sistema de controle de processos fermentativos realizados no biorreator Tecnal BIOTEC-C.



INDICAÇÃO E CONTROLES DE VARIÁVEIS DO PROCESSO FERMENTATIVO

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 – Temperatura | 4 – Saturação de oxigênio |
| 2 – pH | 5 – Agitação do meio |
| 3 – Potencial redox do meio | 6 – Vazão de ar atmosférico |

Fonte; o autor.

Assim, foi realizado a calibração do sensor de oxigênio saturando-se o meio com oxigênio através da agitação e aeração, fixando-se uma saturação de 100%. O sensor de pH foi calibrado previamente, com solução tampão padrão (pH's 4 e 7), contudo este apresentou mal funcionamento, não sendo possível a averiguação do pH do meio fermentativo. Deste modo, as condições de cultivo foram fixadas em: agitação de 300 rpm, fluxo de ar atmosférico de 1 L/min e temperatura de 30°C. Foram esperadas 12h até

a realização do inóculo fúngico, para que as condições do meio fossem estabilizadas, sendo este realizado com o auxílio de uma seringa pela inserção de 75uL (determinado pela contagem de esporos em câmara de Neubauer) da suspensão de esporos (item 3.2.2).

A fermentação durou um total de 137 horas, contadas após a inoculação do meio. Ao longo do processo fermentativo foram retiradas alíquotas de 5 mL (0, 19, 21, 24, 36, 42, 49, 61, 62, 65, 68, 73, 88 e 137h) para a análise cinética da fermentação. Nestes, a concentração de biomassa foi determinada de maneira gravimétrica, pela filtração do meio fermentado em papel filtro quantitativo (Whatman, nº 1001 150) que foi seco em estufa de secagem por 12h e resfriado em dessecador pelo mesmo tempo, a concentração foi calculado segundo a Equação 20. Foram determinadas, também, a concentração de pectina (substrato) (item 3.4) e atividade da PG (item 3.5), presente no meio fermentado. Assim, os parâmetros cinéticos da fermentação foram determinados de acordo com o apresentado na seção teoria (item 4).

$$X \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{P_1 - P_2}{V} \quad (20)$$

Onde, X é a concentração de biomassa, P_1 o peso do papel seco, P_2 o peso do papel antes da filtração e V o volume da amostra de meio fermentado.

3.4. Determinação da concentração de pectina

A concentração de pectina (substrato) presente no meio fermentativo foi determinada pelo método de McComb; Mccready, (1952) com algumas modificações. Neste, 50 µL do meio foi desesterificado pelo uso de uma solução 0,05 M de NaOH. Em seguida, foi acrescido 6 mL de H₂SO₄, previamente resfriado em banho de gelo. A mistura formada foi mantida 10 minutos em banho de água fervente. Posteriormente, 500 µL da solução de carbazol a 0,15% foram adicionados e a reação foi estabilizada durante 30 min à temperatura ambiente, a pectina foi medida, em mg/mL de açúcares redutores, pela leitura em espectrofotômetro UV-vis a 520 nm, com uso de curva de calibração padrão utilizando o ácido α-D-galacturônico (Sigma) como padrão.

3.5. Atividade enzimática da PG

A atividade da PG foi determinada através da liberação de grupos redutores avaliada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNSA), proposto inicialmente por Miller

(1959). Este, utiliza uma curva de calibração padrão feita com ácido galacturônico em concentrações de 0,25 a 5 mg/mL. Através desta, foi obtido uma equação linear capaz de quantificar a concentração de açúcares redutores. Para a determinação da atividade de PG foi utilizado 500 µL de substrato – solução 1,0% (p/v) de pectina cítrica preparada em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 – mais 500 µL de extrato enzimático. A reação foi incubada a 50°C por 40 minutos em banho termostático. Após este tempo 100µL foi retirado para quantificação de açúcares redutores pelo método de DNSA. Aos 100µL da amostra foram adicionados 1 mL de solução de DNSA (0,25g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 75g de tartarato de sódio e potássio; 4g de hidróxido de sódio; 250mL de água destilada), a mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos para formação de cor, resfriados em banho de gelo e adicionados 5,0 mL de água destilada para permitir leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-vis a 540 nm contra branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto (UA = µmol/mL.min). Para determinação da concentração de açúcar redutor utilizou-se a Equação 21.

$$A\left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{[AR].10^{-3}}{194,15.10^{-6}.t.v} \quad (21)$$

Onde, [AR] é a concentração de açúcares redutores, t o tempo e v é a razão entre volume de substrato de reação e o volume de extrato enzimático.

3.6. Proteína total

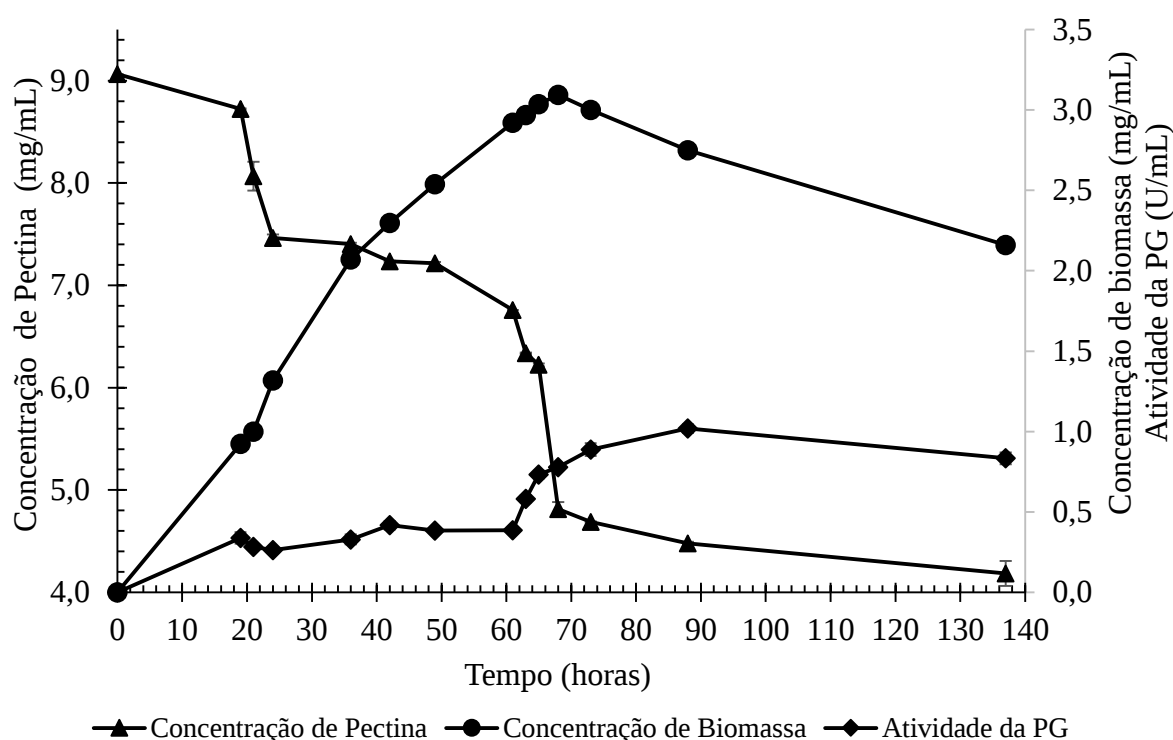
O teor de proteína das amostras foi determinado através do método de Bradford (1976). Para isto, 50µL das amostras são misturados com 1,5 mL do reagente de Bradford (50mL de etanol, 100 ml de ácido ortofósforico, 0,1g de comassie azul brilhante G250 e 850mL de água destilada) para a formação de uma mistura com coloração azul permitindo a leitura em espectrofotômetro UV-vis a 595 nm e a concentração de proteínas é determinada com uso de curva de calibração padrão, construída utilizando-se albumina de soro bovino como padrão – BSA (Merck).

6. RESULTADOS

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Correspondendo a estes componentes, o microrganismo (biomassa), os produtos do metabolismo (especificadamente a PG) e os nutrientes e substratos que compõem o meio de cultura, contudo, opta-se geralmente pela análise do substrato específico da enzima presente no meio fermentativo, neste caso, a pectina.

Deste modo, a Figura 10 apresenta as curvas de consumo de pectina, geração concentração de biomassa, e atividade da PG ao longo da fermentação submersa em batelada por *A. aculeatus* URM 4953 em biorreator.

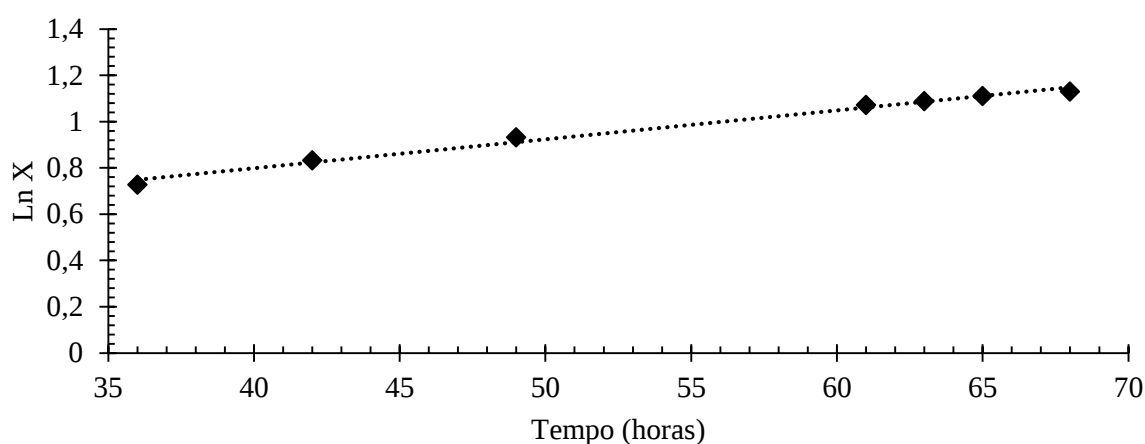
Figura 10. Evolução nas concentrações de biomassa, pectina e atividade da PG durante o processo de fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.



A biomassa fúngica apresentou crescimento detectável, somente, a partir das 19^o hora desde o início da fermentação, levando este período para a adaptação do fungo ao meio de cultivo (fase lag), iniciando, a partir deste momento, a fase exponencial de crescimento que perdurou até 68^o hora.

Para a análise da velocidade máxima de crescimento de biomassa ($\mu_{\max}$) foi traçado o gráfico apresentado na Figura 11. Sendo assim, pelo coeficiente angular da reta formada ($X = 0,0125t + 0,2988$; $R^2 = 0,9904$), pode-se observar que a biomassa microbiana na fase exponencial apresentou uma taxa máxima de crescimento de $0,0125 \text{ h}^{-1}$. Esta é verificada durante a fase exponencial do crescimento microbiano, na qual, para qualquer micro-organismo o seu crescimento atinge taxas maiores que em qualquer um das outras.

Figura 11. Gráfico $\ln X$ versus Tempo de fermentação plotado durante a etapa de crescimento exponencial, para determinação da velocidade máxima de crescimento de biomassa ($\mu_{\max}$) da fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.



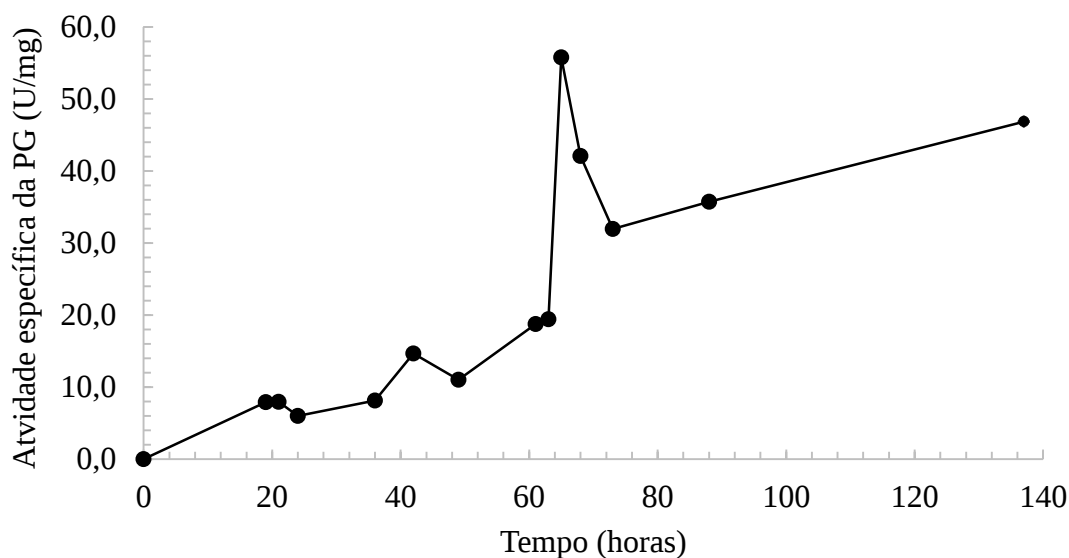
A fase estacionária do crescimento microbiano não foi detectada, devido à grande proximidade entre o pico máximo de concentração de biomassa (68° hora) e o início do decaimento desta (73° hora). Assim, após o pico máximo de concentração da biomassa a velocidade de decaimento ultrapassou a velocidade de crescimento até o término do processo (137° hora) (Figura 12). Isso pode ter ocorrido devido ao esgotamento dos nutrientes no meio, pois como esperado, a concentração de pectina apresentou um decaimento progressivo após as 19° hora, evidenciando, o seu consumo pelo fungo para a formação das estruturas celulares e metabólitos. Assim, a medida que a biomassa aumentou a quantidade de pectina presente no meio diminuiu, até que se tornou pouco disponível após 73° hora (a uma concentração de $4,69 \text{ mg/mL}$) culminando na perda de biomassa fúngica, como já mencionado.

Figura 12. Biomassa fúngica formada no término da fermentação (137h) fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.



A atividade da PG, de maneira geral, aumentou ao longo do processo até as 88 h (1,02 U/mL), com perda de atividade após as 137 h, devido, provavelmente ao processo de desnaturação associado ao fim do acúmulo deste metabólito após uma grande perda de biomassa. Contudo, observando-se que a atividade específica da PG (Figura 13), alterou-se aproximando-se, um pouco mais, do apresentado pela biomassa microbiana, verificando-se um crescimento gradativo desta até as 65^o hora (55,77 U/mg), indicando um aumento da quantidade de PG em função da quantidade de proteínas totais presentes no meio até este ponto, com seu consequente decaimento a partir deste.

Figura 13. Evolução da atividade específica da PG ao longo do processo de fermentação submersa em batelada do *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.



Como mencionado no item 4, uma série de parâmetros cinéticos ligados a fenômenos que ocorrem durante a fermentação puderam ser avaliados. Assim, utilizando

as equações já apresentadas estes parâmetros foram calculados. Os fatores de conversão (Tabela 2) são parâmetros importantes para a predição da concentração de um componente do sistema fermentativo em função de outro, ou seja, a partir do valor do $Y_{x/s}$ torna-se possível determinar a concentração de biomassa, desde que se tenha uma concentração de pectina conhecida ou vice-versa. A mesma relação pode ser estabelecida para concentração de biomassa/atividade da PG ($Y_{x/p}$) e para a atividade da PG/concentração de pectina ($Y_{p/s}$), considerando-os constantes ao longo da fermentação. Sendo, o conhecimento destes fundamentais para a comparação entre diferentes processos fermentativos.

Tabela 2. Fatores de conversão obtidos na análise cinética do processo fermentativo para a produção da PG de *Aspergillus aculeatus* URM 4953 realizada em biorreator.

FATORES DE CONVERSÃO	VALORES OBTIDOS PARA O PROCESSO
Fator de conversão de substrato a biomassa ($Y_{x/s}$)	0,73 gx/gs
Fator de conversão de biomassa a produtos ($Y_{x/p}$)	0,37 U/mgx
Fator de conversão de substrato a produto ($Y_{p/s}$)	0,22 U/mgs

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ESO em biotecnologia trouxe grandes contribuições a formação do aluno, promovendo um maior desenvolvimento do conhecimento científico, de maneira interdisciplinar, trazendo aplicações práticas de diversas disciplinas encontradas na grade curricular do curso, como: bioquímica, operações unitárias, química analítica, dentre outras. Além disto, trouxe o contato do discente com processos fermentativos em biorreatores e a análise de parâmetros intrínsecos a este processo, agregando ainda mais na formação acadêmica deste.

Em adição, a grande quantidade de profissionais, nas mais diferentes áreas, que compõem o CENLAG aliada a política multiusuário dos equipamentos que fazem parte de sua estrutura, auxiliaram no desenvolvimento interpessoal do discente. Apresentando valor à formação profissional deste, uma vez que, independente do ambiente no qual esteja-se desenvolvendo um trabalho, seja o industrial, o laboratorial ou o comercial uma boa relação interpessoal é fundamental para a atuação efetiva nas atividades desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

- ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 264–269, 2017.
- ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A.; MARTINS, M. L. L. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 204–208, 2011.
- ANURADHA, K.; PADMA, P. N.; VENKATESHWAR, S.; REDDY, G. Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 271–274, 2014.
- 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, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 678–684, 2015.
- DAS, A.; RAY, L. Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus* sp.S6 by solid state fermentation. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, p. 3343–3360, 2016.
- DEMIR, H.; TARI, C. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 302–309, 2014.
- FONTANA, R. C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4493–4498, 2009.
- FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal- and external-loop airlift reactors. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 157–163, 2012.
- GHAZI, I.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 204–211, 2007.
- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 89, p. 281–287, 2011.

- HABRYLO, O.; EVANGELISTA, D. E.; CASTILHO, P. V.; PELLOUX, J.; HENRIQUE-SILVA, F. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 499–508, 2018.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215–227, 2001.
- LOPEZ-RAMIREZ, N.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; GAIME-PERRAUD, I.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 291–298, 2018.
- LÓPEZ, D. N.; GALANTE, M.; RUGGIERI, G.; PIARUCHI, J.; DIB, M. E.; DURAN, N. M.; LOMBARDI, J.; DE SANCTIS, M.; BOERIS, V.; RISSO, P. H.; SPELZINI, D. Peptidase from *Aspergillus niger* NRRL 3: Optimization of its production by solid-state fermentation, purification and characterization. **LWT**, v. 98, p. 485–491, 2018.
- LORENZONI, A. S.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized beta-fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 193–197, 2014.
- MARTOS, M. A.; BUTIUK, A. P.; ROJAS, N. L.; HOURS, R. A. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 587–594, 2014.
- MCCOMB, E. A.; MCCREADY, R. M. Colorimetric Determination of Pectic Substances. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 1630–1632, 1952.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.
- NAKKEERAN, E.; GOWTHAMAN, M. K.; UMESH-KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, R. Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 113, p. 634–640, 2012.
- 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. 109, p. 9–18, 2018.
- OZUNA, C. V.; BARRO, F. Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: An alternative to the gluten free diet with no subchronic adverse effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 176e185, 2017.
- PATEL, G.; BISWAS, K.; PATIL, M. D.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Bioreactor studies of production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 77–84, 2018.
- POONDLA, V.; YANNAM, S. K.; GUMMADI, S. N.; SUBRAMANYAM, R.; REDDY OBULAM, V. S. Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate

using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 6, p. 40–50, 2016.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912–919, 2011.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; MOURA, M. S. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 430–436, 2015.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. B. Biotecnologia industrial. 1ª ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 541 p.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. D. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 987–992, 2010.

TAKADA, G.; KAWASAKI, M.; KITAWAKI, M.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.-I.; IZUMORI, K.; ARAI, M. Cloning and Transcription Analysis of the *Aspergillus aculeatus* N^o. F-50 Endoglucanase 2 (cmc2) Gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 482–485, 2002.

TEIXEIRA, M. F. S.; FILHO, J. L. L.; DURÁN, N. CARBON SOURCES EFFECT ON PECTINASE PRODUCTION FROM *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 286–290, 2000.

TORPENHOLT, S.; DE MARIA, L.; OLSSON, M. H. M.; CHRISTENSEN, L. H.; SKJØT, M.; WESTH, P.; JENSEN, J. H.; LO LEGGIO, L. Effect of mutations on the thermostability of *Aspergillus aculeatus* β -1,4-galactanase. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 256–264, 2015.

UAG/UFRPE. História institucional. Disponível em: <<http://ww3.uag.ufrpe.br/historia>>. Acesso em: 07 de Janeiro de 2019.

UENOJO, M.; PASTORE, M. pastore. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388–394, 2007.

UFRPE. Apresentação institucional. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/br/content/apresenta%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em 07 de janeiro de 2019.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 62–67, 2015.

WONG, L. Y.; SAAD, W. Z.; MOHAMAD, R.; TAHIR, P. M. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 175–183, 2017.