



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INGRID ATAÍDE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS β -MANANASES OBTIDAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DA BIOMASSA RESIDUAL DO
AÇAÍ.**

DUQUE DE CAXIAS

2023

INGRID ATAÍDE DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS β -MANANASES OBTIDAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DA BIOMASSA RESIDUAL DO
AÇAÍ.

Monografia apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas: Biotecnologia, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Orientadora: Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra.
Coorientadora: Msc. Victória Pedrosa Souza da Silva.

Laboratório de Microbiologia Industrial – Escola de Química (EQ) – Centro de Tecnologia
(CT), UFRJ.

DUQUE DE CAXIAS
2023

CIP - Catalogação na Publicação

S586c Silva, Ingrid Ataíde da
CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS α -MANANASES OBTIDAS
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DA
BIOMASSA RESIDUAL DO AÇAÍ. / Ingrid Ataíde da Silva.
-- Rio de Janeiro, 2023.
66 f.

Orientadora: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra.
Coorientadora: Victória Pedrosa Souza da Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel
em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. α -mananase. 2. fermentação em estado sólido. 3.
termoestabilidade enzimática. 4. preparado
enzimático. 5. biomassa residual do açaí. I. Gutarra,
Melissa Limoeiro Estrada , orient. II. Silva,
Victória Pedrosa Souza da , coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS β -MANANASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DA BIOMASSA RESIDUAL DO AÇAI.

Monografia apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas: Biotecnologia, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Este trabalho foi aprovado com grau:

Aprovado em _____ de _____ de 2023.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra.
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Mateus Gomes de Godoy.
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Vitor da Silva Liduino.
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho aos meus pais, alicerces da minha vida e meus maiores orientadores na minha formação como ser humano. Grata por tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, família e amigos, e por permitir que tudo isso acontecesse. Gratidão é o sentimento que tenho pois Ele foi essencial em todas as minhas conquistas e superações. Agradeço por me dar perseverança durante toda a minha trajetória e por me rodear de pessoas nada menos do que extraordinárias.

Aos meus pais por estarem sempre presentes, pelo incentivo e apoio em mais uma etapa da minha vida. Agradeço a minha mãe, minha heroína por me amparar nas horas mais difíceis, por me fortalecer nos momentos de desânimo e por vibrar com cada conquista. Ao meu pai que sempre acreditou na minha capacidade, obrigada por toda ajuda prática, sem isso nada disso seria possível. Simone e Givanildo, vocês sempre foram meus maiores exemplos, agradeço eternamente pelo amor incondicional na minha vida sempre. Eu amo vocês.

Agradeço à minha família pelos incentivos que me fizeram chegar até aqui.

À minha orientadora Melissa Gutarra pela oportunidade, suporte e pela confiança depositada neste projeto. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados e pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

À minha coorientadora Victória Pedrosa que me adotou como aluna de iniciação científica. Obrigada por todo suporte e ajuda prática, por me acompanhar no laboratório, por toda experiência compartilhada, por esclarecer inúmeras dúvidas e ser tão paciente.

Meus agradecimentos aos amigos de laboratório Brunno Moreira, Edna Ferreira, Isabela Fontes e Tamires dos Anjos. Agradeço por toda ajuda, troca de conhecimentos e pela companhia, as risadas que compartilhamos deixaram todo o processo mais leve. Sou muito grata por ter feito parte do LAMIND na companhia de vocês.

A todos os meus amigos e colegas de graduação, em especial Sara, Damaris, Maria Eduarda e Desirée por todos os momentos compartilhados, pelo apoio, incentivo, trocas de aprendizado e amizade.

A todos que direta ou indiretamente participaram desta trajetória.

Por fim, agradeço a mim mesma, como não poderia!? Afinal, foi um longo percurso para chegar até aqui e sei o quanto custou, mas sei que nada disso seria possível sem o apoio de todos vocês aqui mencionados.

Agradeço a todos que falaram que daria certo porque realmente deu. O meu mais sincero muito obrigada.

RESUMO

O açaí é um dos mais importantes produtos do extrativismo nacional e um dos principais responsáveis pela visibilidade à biodiversidade da floresta amazônica. Entretanto, assim como outras cadeias produtivas, a exploração do açaí tem como consequência a geração de resíduos agroindustriais, uma vez que 71% a 95% do fruto, principalmente caroço e fibra, são descartados de forma inadequada. O estudo de caracterização físico-química demonstra que o caroço de açaí é uma rica reserva natural de carboidratos, principalmente manose, composto majoritariamente pelo polissacarídeo manana. Já a fibra possui como carboidratos predominantes a glicose e xilose. Essas características fazem do caroço e fibra de açaí uma importante fonte de biomassa para processos biotecnológicos. O presente estudo tem como objetivo a caracterização do extrato enzimático rico em mananases obtido por fermentação em estado sólido (FES) utilizando a biomassa residual do açaí (caroço e fibra) pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*. A estabilidade de estocagem do preparado enzimático sólido obtido também foi avaliada. Para o processo de FES foi utilizado 90% do caroço e 10% da fibra do açaí, concentração do inóculo: 1×10^8 esporos/mL como inóculo; Suplementação com glicina, na razão 50:4 (carbono:nitrogênio), e o processo de FES durou 168h à temperatura de 30°C e 90% de umidade relativa do ar. Para o estudo dos melhores valores de pH e temperatura de atuação da mananase foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) avaliando a temperatura de 36°C à 64°C e pH entre 4,6 e 7,4. Após isso, foi realizada a análise fixando o pH 6,0 e variando a temperatura até 100°C. Utilizando como base o melhor resultado obtido, a termoestabilidade do extrato enzimático bruto foi realizada a pH 6,0 nas temperaturas de 60°C, 65°C e 70°C. Além disso, a estabilidade do preparado enzimático sólido foi avaliada após ser submetidos a secagem (45°C e 55°C) e liofilização, sendo armazenado em temperatura ambiente (30°C) e congelamento (-15°C). No DCCR observou-se que o pH não teve efeito estatisticamente significativo, e a temperatura apresentou efeito positivo, tendo o melhor resultado de atividade enzimática de 373,90 U/g estimados pelo modelo a 64°C e pH em qualquer valor dentro da faixa estudada. Com o pH fixado em 6,0 foi obtida atividade máxima de 64 até 85°C e a enzima se manteve ativa até 100°C. No estudo de termoestabilidade, o extrato enzimático bruto apresentou mais de 80% e 65% da atividade mananásica após 7 e 11 dias respectivamente de incubação a 60°C. A enzima obtida também possui capacidade de ser utilizada a 65°C até 72 horas de reação mantendo atividade relativa superior a 50% e em 70°C em reações de até 4 horas, em processos que priorizam temperatura mais elevada. Os sólidos fermentados após passar pelo processo de secagem (45°C e 55°C) apresentaram atividade residual superior a 50% mesmo após dois meses de estocagem tanto em temperatura ambiente (30°C) quanto em congelamento (-15°C) indicando assim estabilidade de armazenamento sem a utilização de agentes estabilizadores. Já o preparado enzimático sólido submetido ao processo de liofilização, apresentou rendimento de atividade residual acima de 50% quando estocados em congelamento (-15°C) e acima de 40% quando armazenado em temperatura ambiente (30°C). Os resultados deste trabalho sugerem que o extrato obtido rico em β -mananase apresenta características e capacidade para utilização em diversas aplicações biotecnológicas industriais, principalmente em processos que demandam atuação enzimática em pH entre ácido e neutro e processos que demandam por temperatura mais elevadas. Além disso, o PES obtido neste estudo apresentou melhor capacidade de estocagem após o processo de secagem, método mais simples, podendo ser estocado a temperatura ambiente.

ABSTRACT

Açaí is one of the most important products of national extractivism and one of the main responsible for the visibility of the biodiversity of the Amazon rainforest. However, like other production chains, the exploration of açaí results in the generation of agro-industrial residues, which arise, since 71% to 95% of the fruit, mainly the seed and fiber that are discarded improperly. The physical-chemical characterization study demonstrates that the açaí seed is rich natural reserve of carbohydrates, mostly of mannose, composed mainly of the mannan polysaccharide. Fiber has glucose and xylose as predominant carbohydrates. These characteristics make the seeds and fiber açaí an important source of biomass as a potential alternative in biotechnological processes. The present study aims to the characterization of the enzymatic extract rich in mannanases of the solid enzymatic preparation (SEP) obtained by solid-state fermentation (SSF) using the residual biomass of açaí (seed and fiber) by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The storage stability of the solid enzymatic preparation obtained was also evaluated. For the SSF process, 90% of the seed and 10% of the açaí fiber were used, inoculum concentration: 1×10^8 spores/mL; Supplementation with glycine, in the ratio 50:4 (carbon:nitrogen), and the process was conducted by 168h, at temperature of 30°C and 90% relative humidity. In order to study the optimum pH and temperature for the action of mannanase, experiments were planned in a rotational central composite design (RCCD). Temperature were studied between 36°C and 64°C and pH between 4.6 and 7.4. After that, the analysis was performed setting the pH 6.0 and temperature variation up to 100°C. Using the best result obtained as a basis, the thermostability of the crude enzymatic extract was performed at pH 6.0 at temperatures of 60°C, 65°C and 70°C. In addition, the stability of the solid enzymatic preparation was evaluated after being subjected to drying (45°C and 55°C) and lyophilization, being stored at room temperature (30°C) and freezing (-15°C). In the RCCD it was observed that the pH hadn't statistically significant effect and the temperature had a positive effect, with the best result of enzymatic activity of 373.90 U/g estimated by the model at 64°C, in all range of pH. With the pH set at 6.0, maximum activity was obtained up to 85°C and the enzyme remained active up to 100°C. In the thermostability study, the enzymatic crude extract showed more than 80% and 65% of its performance capacity after 168 hours and 11 days, respectively of incubation at 60°C. The enzyme obtained is also capable of being used at 65°C for up to 72 hours of reaction, maintaining relative activity above 50% and at 70°C in of up to 4 hours, in processes that prioritize higher temperatures. The fermented solids after passing through the drying process (45°C and 55°C) showed residual activity greater than 50% even after two months of storage both at room temperature (30°C) and in freezing (-15°C) indicating stability without the use of stabilizers. The solid enzymatic preparation submitted to the lyophilization process, presented residual activity yield above 50% when stored in freezing (-15°C) and above 40% when stored at room temperature (30°C). The results of this work suggest that the obtained extract rich in β -mannanase presents characteristics and capacity for use in several industrial biotechnological applications, mainly processes that demand enzymatic action in pH between acid and neutral and processes that demand higher temperatures. In addition, the solid enzymatic preparation obtained in this study show better storage stability after the drying process, a simpler method that can be used at room temperature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Biomassa residual do açai em contexto urbano.	16
Figura 2: Série histórica açai produção de açai (toneladas) no Brasil nos períodos 2015 a 2021..	20
Figura 3: (a) Fruto do açai, (b) corte longitudinal do fruto (setas indicam a localização da camada de fibra e o caroço), (c) fibras e (d) caroços moídos	21
Figura 4: Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de β , 1–4 manana/heteromanana. (A) Manana Linear, (B) Galactomanana, (C) Glucomanana, (D) Galactoglucomanana	24
Figura 5: Estruturas ilustrativas de diferentes formas de mananas e suas respectivas enzimas essenciais para sua hidrólise. Estruturas típicas de (A) Manana linear, (B) dissacarídeo de Manose, (C) Galactomanana ramificada, (D) Glucomanano linear, (E) Glucomanose e (F) galactoglucomanana ramificada	26
Figura 6: Fluxograma representado as etapas do estudo	35
Figura 7: Biomassa residual do açai (caroço e fibra) utilizados neste trabalho.....	36
Figura 8: Fermentação em estado sólido utilizando o fungo <i>Aspergillus niger</i> e a biomassa residual obtida do despolpamento do açai (90% caroço e 10% fibra).....	40
Figura 9: Representação das melhores condições (pH e temperatura) de atuação da β -mananase através do gráfico de superfície de resposta	43
Figura 10: Atividade enzimática obtida em variação de temperatura e em pH 6,0.	44

Figura 11: Termoestabilidade da β -mananase produzida por FES em biomassa residual de açaí presente no extrato bruto a 60 °C, pH 6,0.	45
Figura 12: Termoestabilidade da β -mananase produzida por FES em biomassa residual de açaí presente no extrato bruto a 65 °C, pH 6,0.	46
Figura 13: Termoestabilidade da β -mananase produzida por FES em biomassa residual de açaí presente no extrato bruto a 70 °C, pH 6,0.	47
Figura 14: Atividade residual obtida da enzima β -mananase adquirida antes e depois dos processos de secagem e liofilização dos sólidos fermentados obtidos por FES em biomassa residual de açaí.	49
Figura 15: Atividade relativa obtida da enzima β -mananase após o processo de secagem a 45°C dos sólidos fermentados estocados a 30°C e -15°C obtidos por FES em biomassa residual de açaí.....	51
Figura 16: Atividade relativa obtida da enzima β -mananase após o processo de secagem a 55°C dos sólidos fermentados estocados a 30°C e -15°C obtidos por FES em biomassa residual de açaí.....	52
Figura 17: Atividade relativa obtida da enzima β -mananase adquirida após o processo de liofilização dos sólidos fermentados estocados a 30°C e -15°C obtidos por FES em biomassa residual de açaí.	53
Figura 18: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (45°C) e estocados (30°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.	54
Figura 19: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (55°C) e estocados (30°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.	55
Figura 20: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (45°C) e estocados (-15°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.	55

Figura 21: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (55°C) e estocados (-15°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.56

Figura 22: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados liofilizados e estocados (30°C e -15°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.....57

Figura 23: Atividade residual obtida da enzima β -mananase após o processo de secagem (45°C e 55°C) e liofilização do preparado enzimático sólido (PES) estocados a 30°C e -15°C durante 1 e 2 meses em relação a atividade enzimática obtida do sólido fermentado in natura obtidos por FES em biomassa residual de açaí.58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Açúcares que participam da composição da biomassa residual do açaí (caroço e da fibra).	22
Tabela 2: Produção de β -mananases com diferentes microrganismos a partir de fermentação em estado sólido.	28
Tabela 3: Produção comercial de β -mananases.	30
Tabela 4: Propriedades bioquímicas das enzimas β - mananases.	32
Tabela 5: Reagentes e seus respectivos fornecedores utilizados neste trabalho.	34
Tabela 6: Níveis reais e codificados (pH e temperatura) para o DCCR.....	38
Tabela 7: Atividade β -mananásica para diferentes condições de pH e temperatura do delineamento composto central rotacional.	41
Tabela 8: Tabela apresentando o efeito padronizado das variáveis temperatura e pH sobre a atividade enzimática e o grau de significância de cada parâmetro.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM - Módulos de ligação ao carbono.

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional.

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico.

FES - Fermentação em estado sólido.

FS - Fermentação Submersa.

g – Grama.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

LBG - Goma de alfarroba (Locust Bean Gum).

PDA - Ágar Batata Dextrose.

PES – Preparado enzimático sólido.

U/g - Atividade enzimática (μmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto em 1 g de matéria seca).

U/mL- Atividade enzimática (μmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto por mL).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Biomassa vegetal.....	18
2.2 Açai.....	19
2.2.1 Caracterização da composição residual do açai.....	20
2.3 Manana.....	23
2.4 Enzimas envolvidas na hidrólise das mananas.....	25
2.4.1 β -mananases.....	27
2.5 Produção de mananases por fermentação em estado sólido.....	27
2.7 Aplicações tecnológicas das mananases.....	29
2.8 Caracterização de β -mananase.....	31
2.9 Extrato bruto enzimático e preparado enzimático sólido.....	33
3. OBJETIVO.....	33
3.1 Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Materiais.....	34
4.2 Métodos.....	34
4.2.1 Coleta e preparo da biomassa residual do açai.....	35
4.3 Crescimento fúngico.....	36
4.4 Fermentação em estado sólido.....	36
4.5 Análise de umidade e pH.....	37
4.6 Extração das Enzimas.....	37
4.7 Caracterização do extrato enzimático bruto.....	37
4.7.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade β -mananásica.....	37

4.7.2	Quantificação da atividade enzimática da β -mananase	38
4.7.3	Avaliação de termoestabilidade	39
4.7.4	Avaliação de estocagem dos sólidos fermentados.	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Atividade do extrato enzimático em diferentes condições de pH e temperatura	40
5.2	Termoestabilidade da β -mananase	45
5.3	Estabilidade de estocagem do preparado enzimático sólido (PES) contendo a enzima β -mananase	49
6.	CONCLUSÃO.....	60
7.	PERSPECTIVAS	61
	REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO.

A agricultura representa uma das principais atividades econômicas no Brasil. Na região Norte do país, por exemplo, um dos produtos de origem vegetal mais consumidos é o açaí. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de açaí no Brasil, no ano de 2021, atingiu 1.485.113 toneladas. O fruto possui um mercado nacional bem desenvolvido e vem cada vez mais ganhando destaque na exportação, sendo o estado do Pará o maior exportador, representando mais de 94% das exportações de açaí do Brasil para o mundo. Nos últimos dez anos, o crescimento da exportação do produto paraense obteve um salto vertiginoso, com o crescimento de quase 15 mil por cento, passando de 41 toneladas exportadas em 2011 para o recorde de 5.937 toneladas em 2020 (CAVALCANTE, 2022).

Entretanto, assim como outras cadeias produtivas, a exploração do açaí tem como consequência a geração de resíduos industriais, que surgem, entre outras etapas, na produção da polpa. Ainda de acordo com o estudo realizado por Bufalino e colaboradores (2018), a polpa comestível representa em média 5% a 19%, isso significa que após o processamento do fruto, 95% a 71% representam a biomassa residual gerada que são descartados de forma inadequada em ruas, cursos d'água ou em aterros sanitários (**figura 1**). Deste modo, a geração de resíduos da produção de polpa de açaí se tornou um problema socioambiental demandando por processos que visem o aproveitamento desses resíduos (MARANHO E DE PAIVA, 2012).



Figura 1: Biomassa residual do açaí em contexto urbano. Fonte: COHEN e AYRES, 2021; SANTOS, 2023.

O estudo de caracterização físico-química desses resíduos apresentado por Lima et al., (2019), demonstra que o caroço de açaí é rico em carboidratos, principalmente manose, representando aproximadamente 75% dos açúcares totais presentes neste resíduo, sendo assim

manana. Por outro lado, a fibra, outro coproduto gerado da exploração do açaí, possui como carboidratos predominantes a glicose e a xilose, apresentando os polissacarídeos celulose e xilana em sua composição. Essas características fazem do caroço e fibra de açaí uma importante fonte de biomassa como potencial alternativa em processos biotecnológicos, sendo um exemplo, seu uso como substrato sólido para obtenção de enzimas de interesse industrial por meio do processo de fermentação em estado sólido (FARINAS et al., 2009).

Com o objetivo de produzir enzimas com potencial catalítico, o processo de fermentação em estado sólido (FES) está sendo estudado progressivamente por apresentar inúmeras vantagens quando comparado com a fermentação submersa (FS), isso porque permite o uso de tecnologias mais simples, além de utilizar como matéria-prima resíduos ou subprodutos agroindustriais sólidos brutos ou que passem por poucos tratamentos contribuindo com a Lei nº 12.305 que determina um destino adequado de resíduos sólidos.

De acordo com Papadaki e colaboradores (2020), o valor de mercado global de enzimas em 2017 apresentava cifras de US\$ 7,1 bilhões e está projetado para atingir US\$ 10,5 bilhões em 2024, os autores ainda relatam que em 2017 foi estimado que cerca de 70% da participação no mercado de enzimas foi detida pelos microrganismos. Apesar disso, o Brasil ainda é um país essencialmente importador de enzimas no geral, estima-se que em 2019 quase 30 mil toneladas de enzimas ou preparações enzimáticas tenham sido importadas pelo Brasil, contra apenas 9,3 mil toneladas exportadas. (MONTEIRO e DO NASCIMENTO SILVA, 2009; SANTANA, 2020). Deste modo, a produção de um extrato enzimático rico em mananases por fermentação em estado sólido utilizando como matriz sólida a biomassa residual do açaí representa uma rota para contribuição da inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática.

Sendo assim, a utilização de caroço e fibra de açaí como substrato para fermentação em estado sólido se torna uma tecnologia com capacidade de síntese de bioprodutos como β -mananase, enzima que possui uma vasta aplicabilidade industrial, como por exemplo nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos, de detergentes, de papel, de ração animal e celulose. A cada dia presenciamos o desenvolvimento de mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores, diante disso, a pesquisa de novas enzimas ou o melhoramento do desempenho de catálise se torna necessário.

Contudo, a indústria encontra desafios, sendo uma das maiores dificuldades encontrar enzimas que possam suportar certas condições industriais como variação de pH e temperatura (MONTEIRO e DO NASCIMENTO SILVA, 2009). Neste contexto, o presente estudo baseia-

se na caracterização do extrato enzimático rico em mananases e estabilidade de estocagem do preparado enzimático sólido (PES), obtidos por fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, a partir dos principais resíduos do açaí, que são caroço e fibra, por meio da avaliação de sua atividade perante variação de pH e temperatura bem como sua estabilidade térmica e de estocagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Biomassa vegetal.

O Brasil, por possuir uma economia fortemente associada à agricultura, gera excessivas quantidades de resíduos da agroindústria. Normalmente, por não possuir uma aplicação direta desses resíduos, pouco ou nenhum valor econômico é atribuído a eles, como é o caso da palha, casca, semente, polpa e muitos outros. Entretanto, o aproveitamento desses resíduos, estão conquistando atenção especial, visto que, são frequentemente compostos por açúcares, fibras e proteínas. Logo, podem ser utilizados como fontes alternativas em processos biotecnológicos, contribuindo para a minimização de problemas ambientais (SANTOS et al., 2018).

A biomassa vegetal é considerada como a fonte mais abundante de carbono do planeta, é um recurso renovável e por esses fatores pesquisas possuem como foco o desenvolvimento de conhecimentos para a produção de produtos de interesse comercial como enzimas com aplicação industrial (FARINAS, 2009). Apesar de sua estrutura ser considerada como uma composição uniforme, a biomassa vegetal pode apresentar diversidade. Isso porque existem diferentes espécies de plantas com significativas diferenças nas proporções de celulose, hemiceluloses e ligninas. Ademais, quando se trata da mesma espécie, pode ocorrer distintas proporções entre os componentes da parede (FARINAS, 2009).

Dentre os tipos de biomassa vegetal, pode-se destacar os materiais lignocelulósicos que representam os materiais orgânicos com maior fartura da biosfera, representando em torno de 60% da biomassa vegetal. Esses materiais podem ser divididos em seis grupos principais: biomassas herbáceas (caniço-malhado, feno de alfafa), madeira de conífera (pinheiro e abeto), madeira de lei (álamo alpino e álamo), resíduos celulósicos (lodo de papel e papel reciclado, jornais), resíduos de colheitas (bagaço de cana de açúcar, palha de milho) e resíduos sólidos municipais (RODRIGUES et al., 2017).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (30% a 50%), hemicelulose (15% a 35%) e lignina (10% a 30%), sendo a concentração de cada um desses

elementos variável de acordo com a espécie do vegetal, tipo de tecido, fatores ambientais e estágio de desenvolvimento (ISIKGOR e BECER, 2015). Cada uma das frações dos materiais lignocelulósicos pode ser aplicado com uma finalidade, por exemplo, as porções que apresentam celulose e hemicelulose na biomassa podem ser hidrolisadas a vários açúcares e então utilizadas em processos de fermentação. Já as ligninas podem ser degradadas a frações de massas molares menores, sendo usadas em vários processos químicos, como na produção de fenol e etileno, além de serem convertidas em fibras de carbono. Os materiais e resíduos lignocelulósicos podem desenvolver o papel de matéria-prima para a produção de alimentos, combustíveis, enzimas e bens de consumo diversos (RODRIGUES, 2017).

Um dos produtos de origem vegetal mais consumidos, na região norte do país, é o açaí, que tem como resíduos gerados após o seu processamento, a fibra e caroço, que são majoritariamente descartados de forma inadequada em ruas, cursos d'água ou em aterros sanitários, se tornando uma problemática socioambiental (MARANHO E DE PAIVA, 2012). Em vista disso, a conversão dessa biomassa vegetal em produtos de valor comercial poderá contribuir para a remoção de poluentes ambientais e trazer rendimentos à economia.

2.2 Açaí.

O açaí é um fruto bacáceo de cor roxa, proveniente do açazeiro, planta nativa da Amazônia Brasileira, e representa a espécie mais importante do gênero *Euterpe*, dentre as dez registradas no Brasil e das sete que ocorrem na Amazônia, mas apenas 3 (três) são de interesse, do ponto de vista agroindustrial: *E. oleracea*, *E. edulise*, e a *E. precatória*.

A *Euterpe oleracea* possui prevalência nos Estados do Pará e Amapá, sendo responsável pela maior parte da produção. Já a *Euterpe edulis*, possui habitat na Mata Atlântica e a *Euterpe precatória*, possui dominância no Estado do Amazonas (TAVARES, 2015).

Verifica-se que a produção de açaí no mercado brasileiro sucede de forma consecutiva nos últimos anos, sendo em 2021 a produção de açaí mais de 1.400.000 toneladas. A série histórica (**figura 2**) do fruto possui um ponto de inflexão de 2018 para 2019, quando ocorreu a redução de aproximadamente 7% na quantidade total produzida. Desde então, a produção de açaí tem reagido e voltado a crescer, porém sem alcançar os dígitos de produção de 2018, que foram os maiores dentro da série histórica.

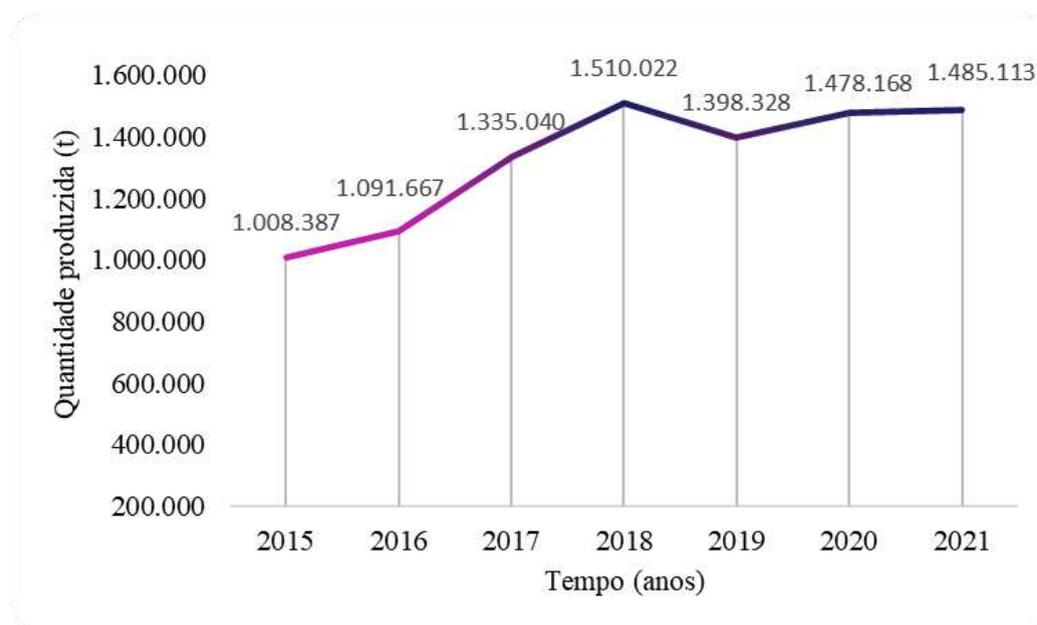


Figura 2: Série histórica açaí produção de açaí (toneladas) no Brasil nos períodos 2015 a 2021. Fonte: De autoria própria (IBGE).

A produção de açaí é uma das cadeias produtivas mais importantes para o estado do Pará, com um volume anual de mais de 1,3 milhão de toneladas de frutos e área plantada, responsável por 93% da produção nacional sendo Igarapé-Miri a cidade com maior produção. O estado do Amazonas aparece na segunda posição com 83 mil toneladas e Bahia em terceiro lugar, com a produção de 4.645 toneladas do fruto (IBGE, 2021). Cabe destacar que só no estado do Pará, o açaí movimentou, em 2021, mais de 5 bilhões de reais, negócio que atrai pequenos, médios e grandes produtores (LIMA, 2023).

A estrutura do fruto pode ser dividida principalmente em: mesocarpo, epicarpo e endocarpo. O mesocarpo é a parte interna comestível do fruto do açaizeiro, situada entre o epicarpo e o endocarpo. O epicarpo representa a parte externa dos frutos que corresponde, no caso de frutos do açaizeiro à casca, e o endocarpo é a parte interna do fruto que, no caso do fruto do açaizeiro, corresponde à semente (EMBRAPA, 2006).

2.2.1 Caracterização da composição residual do açaí.

De acordo com BUFALINO e colaboradores (2018) em média apenas 5% a 19% representa a polpa comestível do açaí, desse modo após o processamento do fruto, 95% a 71% do volume representa a biomassa residual gerada, após o processo do despulpamento, sendo caroço e fibra os principais resíduos obtidos (**figura 3**).

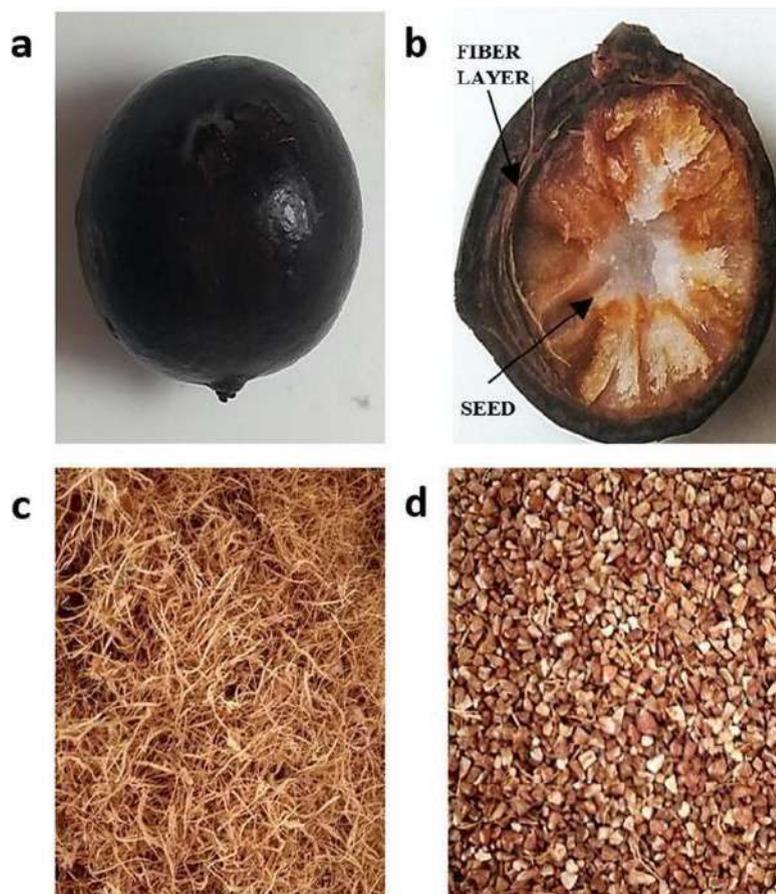


Figura 3: (a) Fruto do açaí, (b) corte longitudinal do fruto (setas indicam a localização da camada de fibra e o caroço), (c) fibras e (d) caroços moídos (Fonte: LIMA et al., 2019).

Assim como a maioria das matérias primas, a composição do açaí pode sofrer variações de acordo com a safra, o solo, a variedade vegetal, o clima e o processamento durante a colheita e estocagem. Conforme relatado por LIMA e colaboradores (2019), a colheita do açaí ocorre em dois períodos distintos: no inverno (período de chuvas intensas na Amazônia, que se estende de janeiro a junho) e no verão (de julho a dezembro). A espessura da parede celular do caroço de açaí depende do estágio de maturação do fruto. Desse modo, dependendo do período de coleta da amostra, a composição do caroço pode variar. No inverno, os frutos podem estar em diferentes estágios de maturação no mesmo cacho, enquanto no verão os frutos são mais numerosos e seu nível de maturação mais homogêneo.

Lima e colaboradores (2019) citam que estudos encontrados na literatura relatam que o caroço do açaí é uma biomassa lignocelulósica, onde a caracterização química indicou a celulose como componente predominante (34-53%), seguida de lignina e hemicelulose com grandes variações (3-25% e 6-18%, respectivamente) e menor concentração de proteína (4-7%). Entretanto, o estudo de Lima e colaboradores (2019), Monteiro e colaboradores (2019) e

de Rambo e colaboradores (2015) apresentaram em sua caracterização química que a biomassa residual do açaí é rica em manose, indicando que o polímero predominante é a manana, conjugada ou não com outros açúcares.

A caracterização físico-química da biomassa residual (caroço e fibra) do processamento do açaí realizada por Lima e colaboradores (2019), demonstra que estes componentes apresentam composição química estatisticamente diferente. O caroço apresenta em sua composição principalmente manose, seguida de glicose e galactose. Xilose e arabinose também foram detectadas em menores concentrações. Essa composição de açúcares obtida para o caroço de açaí foi compatível com a obtida por Rambo e colaboradores (2015), que encontraram manose, glicose, xilose e galactose no caroço (**tabela 1**). Para mais, Neto e colaboradores (2010) investigaram a anatomia das sementes durante o processo de germinação com o auxílio de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, e concluíram que a parede celular do endosperma é provavelmente composta por manana. Contudo, a composição química da fibra de açaí apresenta concentrações diferentes, sendo a glicose e xilose os principais açúcares, também foram detectados arabinose, galactose e manose em menores porcentagens (**tabela 1**).

Tabela 1: Açúcares que participam da composição da biomassa residual do açaí (caroço e da fibra).

Biomassa	Arabinose (%)	Galactose (%)	Glicose (%)	Manose (%)	Xilose (%)	Referências
	0,69 ± 0,10	1,43 ± 0,03	8,66 ± 0,03	53,60 ± 0,05	3,18 ± 0,40	Rambo et al., 2015
Caroço do açaí	0,8 ± 0,03	1,9 ± 0,06	5,7 ± 0,10	74,9 ± 1,19	0,6 ± 0,03	Lima et al., 2019
	0,85 ± 0,03	2,61 ± 0,12	4,61 ± 0,48	47,19 ± 2,58	1,13 ± 0,16	Monteiro et al., 2019
Fibra do açaí	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	29,7 ± 0,9	0,7 ± 0,2	18,6 ± 0,6	Lima et al., 2019
	0,82 ± 0,03	0,90 ± 0,04	21,88 ± 0,46	nd*	15,12 ± 0,39	Monteiro et al., 2019

nd* = não detectado

Ainda de acordo com Lima e colaboradores (2019), a fibra contém cerca de 27% de celulose, 18% de hemicelulose e em torno de em torno de 35% de lignina, deste modo a composição química da fibra exerce grande influência nos resultados de conversão de energia

e bioprodutos. A celulose pode ser aplicada para produção de bioetanol, sendo ainda um indutor para produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação em estado sólido. Ademais, o baixo teor de cinzas indica que essas biomassas (caroço e fibras) seriam atrativas nos processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, como o bioetanol. O baixo teor de cinzas também é um indicativo de que não haverá a inibição de certas enzimas como as β -mananase.

Os elementos majoritários presentes nesta biomassa são: carbono, hidrogênio e oxigênio. No caso do caroço, o carbono representa entre 44% e 48%, oxigênio 45% a 49% e porcentagens mais baixas de hidrogênio (7%). As fibras apresentam uma variação de carbono (50% -49%), oxigênio (42-15%) e hidrogênio (6%). Altas concentrações de carbono demonstra esta biomassa como meio de cultura para produção de enzimas por fermentação em estado sólido (LIMA et al, 2019).

2.3 Manana.

A manana é um importante componente da família das hemiceluloses, nas plantas apresentam papel estrutural e possuem também função de armazenamento como reservas de carboidratos não amiláceos. Outrossim, podem ter uma função adicional atuando como molécula sinalizadora no crescimento e desenvolvimento das plantas (MOREIRA e FILHO, 2008).

Sua composição química consiste em uma cadeia principal de manana composta por resíduos de manose unidos por ligações do tipo β -1,4 ou uma combinação de resíduos de glicose e manose associados pelo mesmo tipo de ligação. A cadeia principal da manana pode também apresentar cadeias laterais ligadas a resíduos de α -1,6-galactose. As mananas são classificadas em quatro subfamílias: manana linear, galactomanana, glucomanana e galactoglucomanana (**figura 4**).

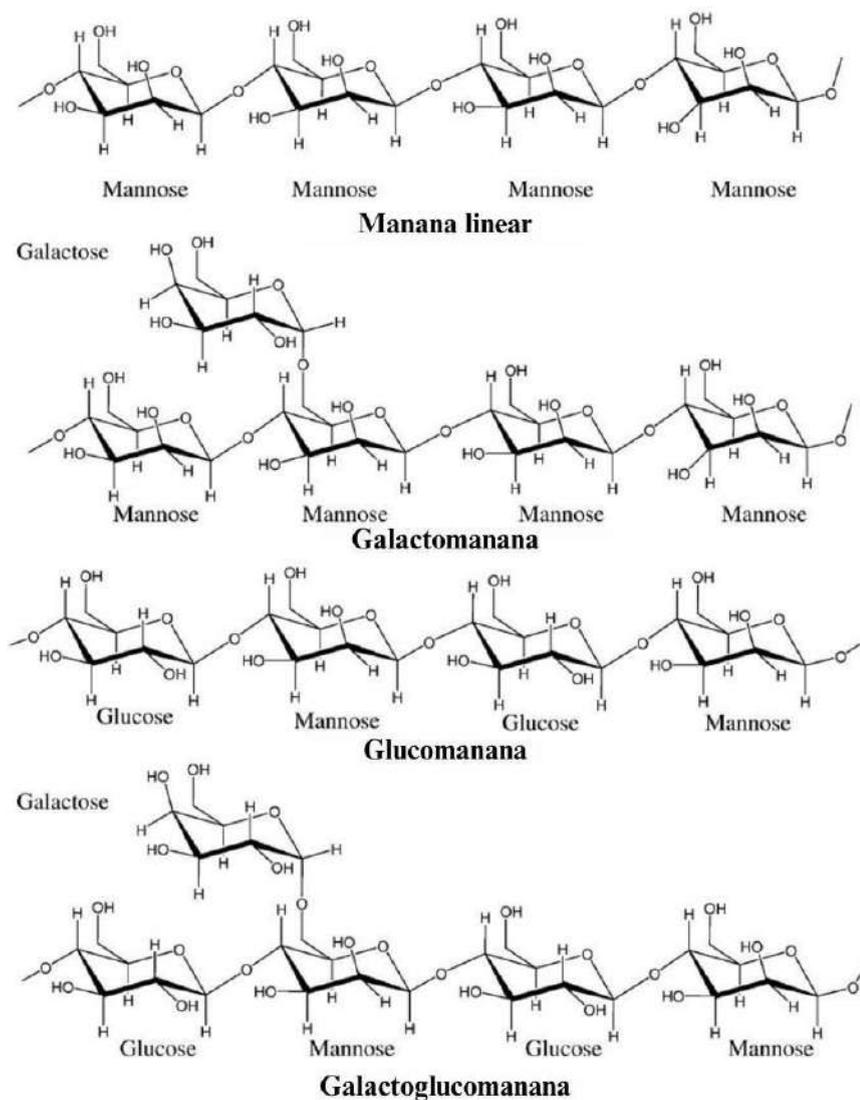


Figura 4: Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de β , 1–4 manana/heteromanana. (A) Manana Linear, (B) Galactomanana, (C) Glucomanana, (D) Galactoglucomanana (Adaptado de SRIVASTAVA e KAPOOR, 2017).

As mananas lineares são homopolissacarídeos compostos por cadeias principais lineares composta por resíduos de manose unidos pela ligação do tipo β -1,4, este tipo de manana apresenta menos de 5% de galactose. A manana linear pode apresentar função estruturais em diversas plantas, entretanto também fazem parte das paredes celulares de algumas algas (MOREIRA e FILHO, 2008).

As glucomananas possuem sua estrutura de cadeia principal formada por resíduos de D-manose e D- glicose intercalados na proporção 3:1 ligados por ligações glicosídicas β -1,4. As glucomananas estão presentes em pequenas quantidades na composição da hemicelulose de angiospermas e representam em torno de 3-5% do material total da parede celular. Além disso,

possuem uma variedade de aplicações, o que inclui prevenção de doenças crônicas e agente de controle de peso (MOREIRA e FILHO, 2008).

As demais subdivisões são unidas pelos grupos laterais por meio de ligações do tipo α -1,6. Cadeias lineares de mananas e glucomananas apresentando mais de 5% (p/p) de D-galactose são nomeadas galactomananas e galactoglucomananas, respectivamente. Os galactomananos apresentam função fisiológica em sementes por reterem água por salvação, assim sua presença em sementes de regiões que apresentam altas temperaturas atmosféricas é muito importante para evitar a secagem completa das sementes. Do ponto de vista industrial e alimentício, as propriedades reológicas das galactomananas, isso inclui espessamento e efeitos aditivos, têm sido empregadas em uma ampla variedade de processos. No caso das galactoglucomananas, sua solubilidade em água é devido ao seu conteúdo relativamente grande de cadeias laterais de galactose que acaba impedindo o alinhamento de macromoléculas de modo a resultar na formação de fortes ligações de hidrogênio (MOREIRA e FILHO, 2008).

O estudo de Lima e colaboradores (2019) sugere que o caroço de açaí provavelmente possui sua composição formada a partir de manana linear, somado a outros açúcares que podem compor outros polissacarídeos como por exemplo, arabinoxilana.

2.4 Enzimas envolvidas na hidrólise das mananas.

As enzimas são heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente através de ligações peptídicas. A complexa estrutura molecular enzimática é principalmente composta por uma parte proteica, entre ela pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. As enzimas possuem sua estrutura molecular assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals. As enzimas podem ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbiana, tendo como papel principal a aceleração da velocidade de uma reação. Sua atividade catalítica, assim como a estabilidade, depende da sua estrutura tridimensional e condições ambientais, tais como pH e temperatura, afetam a estrutura da enzima, e conseqüentemente, suas propriedades (Lima et al., 2001).

As principais enzimas envolvidas na hidrólise de mananas são 1,4- β -D-mananamanohidrolases (β -mananases), 1,4- β -D-manopiranosídeo hidrolases (β -manosídeses) e 1,4- β -D-glicosídeo glicohidrolases (β -glicosídeses). A cadeia principal de manana é hidrolisada por β -mananases, ao passo que α -galactosídeses e acetilmananaesterase atuam

liberando os grupos galactose e acetil, respectivamente. A ação das β -mananases geram os produtos manose e oligossacarídeos de manose ou glucomanose, que são posteriormente hidrolisados por β -manosidase e β -glicosidase para finalmente produzir os monossacarídeos manose, glicose e galactose, dependendo da composição da manana (**Figura 5**) (VAN ZYL et al., 2010).

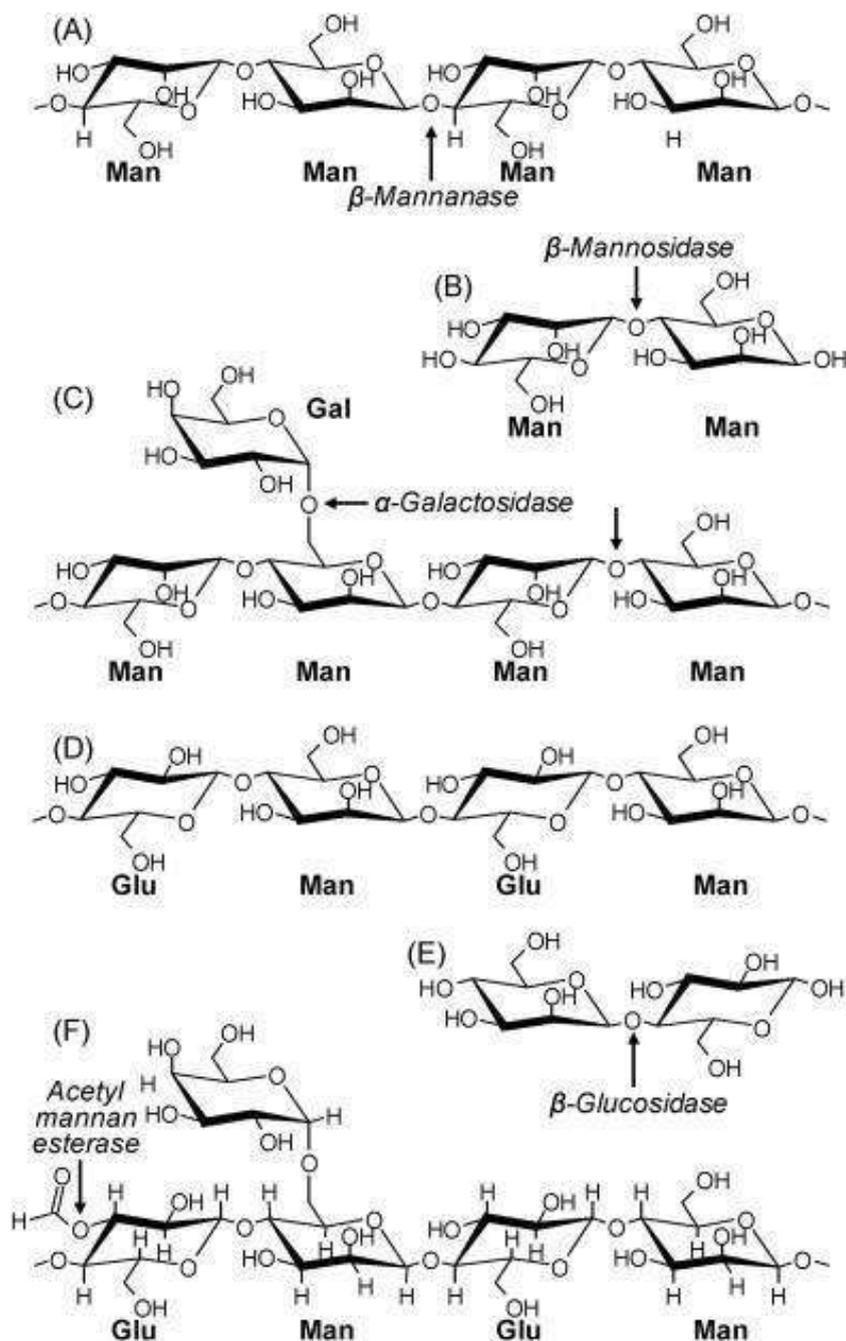


Figura 5: Estruturas ilustrativas de diferentes formas de mananas e suas respectivas enzimas essenciais para sua hidrólise. Estruturas típicas de (A) Manana linear, (B) dissacarídeo de Manose, (C) Galactomanana ramificada, (D) Glucomanano linear, (E) Glucomanose e (F) galactoglucomanana ramificada (VAN ZYL et al., 2010).

2.4.1 β -mananases.

As β -mananases (EC 3.2.1.78) são hidrolases de ação endo que atuam catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas internas da cadeia principal de mananas, liberando β -1,4-mano-oligossacarídeos curtos (VAN ZYL et al., 2010). Os principais mano-oligossacarídeos liberados são manobiose e manotriose que são clivados em manose pelas β -manosidases, enzimas exo- hidrolases, que atuam em extremidades não redutoras (MOREIRA e FILHO, 2008; VAN ZYL et al., 2010). As mananases estão presentes na natureza e foram isoladas de bactérias, fungos, plantas e animais. A fermentação submersa e a fermentação em estado sólido são usadas predominantemente para a produção de β -mananases microbianas. Vários grupos de pesquisa possuem como objetivo melhorar a produção de endo- β -mananase através da otimização do processo (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2017).

As endo- β -mananases microbianas de tipo selvagem são extracelulares e sua produção pode ser influenciada por parâmetros físico-químicos e nutricionais como pH, tempo de incubação, temperatura, teor de nitrogênio e fonte de carbono. Abordagens como um fator de cada vez, métodos estatísticos como Plackett-Burman, Box-Behnken e delineamento composto central e até mesmo suas combinações podem ser utilizadas com o objetivo de melhorar a produção de endo- β -mananase (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2017).

2.5 Produção de mananases por fermentação em estado sólido.

As mananases são conhecidas por serem produzidas por uma variedade de bactérias, fungos, plantas e animais. Tais enzimas, costumam ser produzidas, em sua maioria, por meio da fermentação submersa (CHAUHAN, 2012). Entretanto, a fermentação em estado sólido vem obtendo espaço entre as pesquisas, especialmente para produção de enzimas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos, geralmente presentes em resíduos agroindustriais (SANTOS et al., 2018).

O processo de fermentação submersa (FS) compõe-se na introdução do microrganismo em meio líquido. Nesse método, o meio fica contido em biorreatores podendo ter controle de agitação, aeração, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros fatores. Além disso, os nutrientes na maioria das vezes encontram-se dissolvidos no meio líquido sendo facilmente acessados pelos microrganismos (MONTEIRO e DO NASCIMENTO SILVA, 2019). Em contrapartida, a fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como aquela que ocorre em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água não absorvida nos

sólidos. Porém, os substratos devem conter umidade suficiente para que possa ocorrer o crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do microrganismo (MONTEIRO e DO NASCIMENTO SILVA, 2019). Esta técnica tem se mostrado vantajosa, pois se utiliza de substratos com baixo valor agregado, como, por exemplo, a utilização de resíduos lignocelulósicos. Outrossim, pode utilizar de adição de nutrientes suplementares ao substrato, apresentar volume do meio reduzido e menor investimento em biorreatores. Outra vantagem se baseia na menor quantidade de água que reduz problemas de contaminação, altos rendimentos na formação de metabólitos e facilidade na obtenção de extrato bruto concentrado (MONTEIRO e DO NASCIMENTO SILVA, 2009).

É importante destacar ainda que o processo de fermentação em estado sólido possui como característica simular o hábitat natural de fungos selvagens, também possibilita maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH (SANTOS et al., 2018). Variedades de microrganismos como bactérias, **tabela 2** apresenta alguns exemplos de meio fermentativo para a produção das β -mananases a partir da FES por diferentes microrganismos.

Tabela 2: Produção de β -mananases com diferentes microrganismos a partir de fermentação em estado sólido.

Microrganismo	Meio Fermentativo	Referência Bibliográfica
<i>Aspergillus niger</i>	Torta de palmiste	Abdeshahian et al., 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	Rodríguez-Zúñiga et al., 2011
<i>Bacillus sp.</i>	Resíduo de coco	Srivastava e Kapoor 2013
<i>Aspergillus niger</i>	bagaco de maçã e pó de semente de algodão	Yin et al., 2013
<i>Penicillium chrysogenum</i>	pó de palha de milho e farelo de trigo	Zhang e Sang, 2015
<i>Aspergillus terreus</i>	Farinha de copra	Soni et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farinha de copra	Jana et al., 2018
<i>Trichoderma longibrachiatum RS1</i>	Palha de arroz	Ismail et al., 2019
<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	Farinha de copra	Suryawanshi et al., 2019
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de café e farelo de trigo	Favaro et al., 2020

Microrganismo	Meio Fermentativo	Referência Bibliográfica
<i>Penicillium citrinum</i>	Biomassa residual de açaí	Lima et al., 2021
<i>Aspergillus niger</i>	Biomassa residual de açaí	Silva, 2022

Uma espécie de microrganismo que se destaca entre os fungos filamentosos utilizados no processo de fermentação em estado sólido é o ascomiceto *Aspergillus niger*, com uma vasta história de uso seguro e aplicações agroalimentares representando ainda um dos mais importantes microrganismos aplicados em biotecnologia industrial. *A. niger* é conhecido por secretar uma diversidade de enzimas com capacidade de catalisar a hidrólise de biomassas vegetais em açúcares, sendo algumas destas enzimas utilizadas para aplicações industriais (TSANG et al., 2009). Além disso, muitas enzimas produzidas por *A. niger* são consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*), pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos, ou seja, são consideradas seguras sob a condição de que cepas não patogênicas e não toxigênicas e boas práticas de fabricação sejam usadas em sua produção (SCHUSTER et al. 2002).

Ainda conforme descrito na **tabela 2**, os resíduos agroindústrias se tornam objeto de pesquisa com objetivo de serem aproveitados como meios fermentativos no processo de FES, o estudo realizado por Lima e colaboradores (2021) e Silva (2022) destacam a utilização da biomassa residual de açaí como meio fermentativo com objetivo de produzir enzimas β -mananases a partir dos fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*, respectivamente.

2.7 Aplicações tecnológicas das mananases.

A maioria das β -mananases comerciais são produzidas a partir de microrganismos devido à sua maior estabilidade, custo-benefício e facilidade de manipulação genética. Tais características aumentam seu valor de mercado e os torna candidatos adequados para aplicações na indústria. Esses catalisadores biológicos são aplicados em diversos processos industriais como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentação animal e de detergentes, papel e celulose, e esses processos catalisados por enzimas são comumente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis. A **tabela 3** apresenta a produção comercial de β -mananases, incluindo o nome da empresa e seu respectivo país de origem, fonte da mananase e marca comercial. As marcas comerciais Hemicell[®] e Nutrizyme[®] possuem o mercado direcionado à nutrição animal a partir das enzimas, já as marcas Mannaway[™] e Purabrite[™] são voltadas para

a indústria de detergentes e as marcas Pyrolase160 e Pyrolase200 comercializam suas β -mananases para o uso na perfuração de petróleo, enquanto a marca E-BMANN possui seu mercado voltado para pesquisa, ensaios bioquímicos de enzimas e análises de diagnóstico *in vitro*.

Tabela 3: Produção comercial de β -mananases.

Empresa	País	Fonte de mananase	Marca comercial
ChemGen	Estados Unidos	<i>Paenibacillus lentus</i>	Hemicell®
CTC Bio Inc	Seul, Coréia do Sul	<i>Bacillus lentus</i>	CTCzyme®
Sunson	China	<i>Bacillus lentus</i>	Nutrizyme®
Novo Nordisk	Dinamarca	<i>Aspergillus niger</i>	Gamanase®
Advanced Enzymes	Índia	n.i	DigeGrain M
Novozymes	Dinamarca	<i>Talaromyces leycettanus</i>	Mannaway
Aumgene Biosciences	Índia	n.i	Mannazyme XP®
PhylloZyme	Estados Unidos	<i>Trichoderma reesei</i>	Cp-mannanase
Genencor International	Estados Unidos	n.i	MannaStar™
Megazyme	Irlanda	<i>Aspergillus niger</i>	E-BMANN
Genencor International	Estados Unidos	β -mananase fúngica	Purabrite
Diversa Corp.	Estados Unidos	<i>Thermotoga sp.</i>	Pyrolase160
Diversa Corp.	Estados Unidos	<i>Thermotoga sp.</i>	Pyrolase200

n.i = não informado

Fonte: Dawood e Ma, 2020

Ultimamente, as β -mananases estão sendo usadas como intensificadores de remoção de manchas em determinados segmentos de lavanderia, isso porque possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de diferentes materiais à base de manana, como goma guar, encontrada em produtos de consumo, incluindo molho barbecue, sorvete e maquiagem. Essas gomas agem como cola e grudam, dificultando a remoção da sujeira, as β -mananases hidrolisam efetivamente essas gomas, removendo-as do tecido e evitando que a sujeira grude no tecido.

Na clarificação de suco de frutas, a β -mananase catalisa a hidrólise na fração manana da hemicelulose presente no suco de frutas, reduzindo sua viscosidade e liberando a água aprisionada em seu interior, assim a hidrólise de β -mananase clarifica o suco de frutas e aumenta

o seu rendimento e qualidade. Para mais, as β -mananases podem ser boas candidatas na indústria de papel e celulose, juntamente com as xilanases, já que preparam a lignina para ser removida com bastante facilidade, reduzindo a quantidade de produtos químicos usados nas etapas subsequentes (DAWOOD e MA, 2020).

Estudos relatam que ocorreu a melhora na utilização de nutrientes, eficácia de conversão alimentar, maior produção de ovos, melhor desempenho de crescimento e imunidade após o uso de mananases na alimentação de aves (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2017). Outra aplicação desempenhada pelas β -mananases é na produção de mananoligossacarídeos (MOS), neste caso, o manano é degradado em MOS pela β -mananase gerando uma espécie de prebióticos que podem ser usados para suprimir reações alérgicas (DAWOOD e MA, 2020).

2.8 Caracterização de β -mananase.

Com o objetivo de atender às necessidades industriais, uma β -mananase considerada ideal necessita apresentar certas propriedades que incluem alta atividade específica, boa termoestabilidade e atividade em ampla faixa de pH (DAWOOD e MA, 2020). Contudo, provavelmente a maior dificuldade da indústria seja encontrar enzimas que suportam algumas condições industriais como variação de temperatura e pH. Em vista disso, a pesquisa por novo modo de produção ou o melhoramento do desempenho de catálise de enzimas se torna necessário tornando a busca de microrganismos com capacidade de produzir enzimas com características industriais, cada vez mais constante.

O efeito do pH na atividade das enzimas se resulta devido ao fato de essas serem formadas por grupos químicos, na maioria das vezes aminoácidos, que podem sofrer ionizações e adquirir cargas momentâneas, resultando em uma mudança conformacional da estrutura da enzima, afetando o modelo “encaixe induzido”. Já a temperatura influencia a atividade enzimática porque possui a capacidade de aumentar a energia cinética das moléculas e conseqüentemente o aumento na probabilidade de encontro entre a enzima e o substrato. Todavia, em altas temperaturas a maioria das enzimas sofrem mudanças conformacionais devido ao rompimento de ligações e interações fracas, um processo denominado de desnaturação que, para o caso da temperatura e para a maioria das enzimas, é um processo irreversível. Sendo assim, cada enzima possui um valor ótimo de pH e temperatura, no qual a atividade da enzima é máxima em faixas de atuação (MONTEIRO e DO NASCIMENTO SILVA, 2009). A **tabela 4** apresenta algumas propriedades bioquímicas como pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e termoestabilidade das enzimas β - mananases.

Tabela 4: Propriedades bioquímicas das enzimas β - mananases.

Microrganismo	pH ótimo	Estabilidade (pH)	Temperatura ótima (°C)	Estabilidade (temperatura)	Referências
Bactérias					
<i>Paenibacillus</i> sp. DZ3	6.0	>70%/pH 5–7/1 h/4°C	60	100%/60°C/1h	CHANDRA et al., 2011
<i>Bacillus circulans</i> M-21	7.0	>80%/pH 6–9/1 h/30°C	50	>80/40°C/4 h	MOU et al., 2011
<i>Bacillus nealsonii</i> PN1	8.8	5.0-10.0	65	T _{1/2} 3h / 70 °C	CHAUHAN et al., 2014
<i>Clostridium</i> <i>cellulovorans</i>	5.5-7.0	5.5-7.0	40	90min/ 37 °C; 30 min/50°C	MALGAS et al., 2015
Fungos					
<i>Scopulariopsis</i> <i>candida</i> LMK 004	5.0	>80%/pH 5– 6.5/24 h/4°C	50	100%/30–40°C/3 h	MUDAU e SETATI, 2008
<i>Scopulariopsis</i> <i>candida</i> LMK 008	6.0	>60%/pH 5– 6.5/24 h/4°C	40	100%/30–40°C/3 h	MUDAU e SETATI, 2008
<i>Aspergillus flavus</i> <i>gr</i>	6.0	>80%/pH 4–8/16 h/4°C	60	>50%/60°C/6h	KOTE et al., 2009
<i>Aspergillus niger</i>	5.5	>80%/pH 4–8/16 h/4°C	65	50%/ 60°C/8h	KOTE et al., 2009
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3448	5.5	100%/pH 4–6/2 h/45°C	55	100%/55°C/ 15min	FATTAH et al., 2009
<i>Aspergillus niger</i>	3.5	>80%/pH 3,5– 7,0/24 h/50°C	50,70	>50%/60°C/6h	NORITA et al., 2010
<i>Penicillium</i> <i>occitanis</i> Pol 6	4.0	>70%/pH 4–10/24 h	40	>80%/50°C/30 min	BLIBECH et al., 2010 ; BLIBECH et al., 2011
<i>P. Citrinum</i>	4.6	4.6	40-60	90%, 40C, 5h	Lima et al., 2021

Fontes: SRIVASTAVA e KAPOOR, 2017; CHAUHAN et al., 2012; Lima et al., 2021.

Conforme apresentado na **tabela 4**, em geral o pH ideal para a atividade da maioria das mananases bacterianas é relatado na faixa de pH neutro, enquanto mananases fúngicas na faixa ácida. Ademais, as mananases microbianas possuem capacidade de atuação em diferentes temperaturas, por isso encontraram aplicações nas indústrias de papel e celulose, farmacêutica, alimentícia, de rações, petróleo e têxtil (CHAUHAN et al., 2012).

2.9 Extrato bruto enzimático e preparado enzimático sólido.

Apesar de possuírem alta eficiência catalítica, mananases comerciais purificadas apresentam maiores custos. Como alternativa à utilização de enzimas purificadas em processos, pode ser utilizado o extrato bruto com o objetivo de simplificar e diminuir os custos de produção (TAVARES, JÚNIOR e FRANCO, 2015). As enzimas imobilizadas, apesar de apresentarem algumas vantagens sobre as livres, também apresentam maior custo de produção. Em vista disso, uma alternativa de menor custo é o uso de preparado enzimático sólido (PES) em reações catalíticas. O PES, ou sólido fermentado, é produzido por meio do cultivo em estado sólido de algum microrganismo e posterior tratamento do cultivo, para retirar a umidade, de forma a gerar um sólido contendo atividade enzimática. Esta tecnologia é simples e fácil, apresentando bons resultados em termos de atividade residual e estabilidade enzimática e baixo custo de produção. O substrato usado para o cultivo em estado sólido nestes casos pode ser um resíduo agroindustrial, reduzindo ainda mais o custo de produção de enzimas e aumentando o potencial da técnica para processos industriais (EICHLER, 2018). Em vista disso, tanto o extrato bruto enzimático quanto o preparado enzimático sólido possuem capacidade de serem empregues em reações catalíticas de forma mais fácil e econômica, quando a enzima purificada não é exigida.

3. OBJETIVO.

O presente trabalho possui como objetivo principal a caracterização das β -mananases presente no extrato enzimático bruto obtido por fermentação em estado sólido a partir da biomassa residual do açaí (*Euterpe oleracea*) utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

3.1 Objetivos específicos.

- Obtenção do preparado enzimático sólido (PES) e extrato enzimático bruto rico em mananases empregando a biomassa residual do açaí, sendo estes, caroço e fibra.

- Avaliar a atividade enzimática das β -mananases presente no extrato bruto frente a variação de pH e temperatura utilizando como ferramenta o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Avaliar a termoestabilidade das β -mananases presentes no extrato bruto nas temperaturas de 60°C, 65°C e 70°C;
- Avaliar a estabilidade das β -mananases presentes nos sólidos fermentados (PES) secos em estufa na temperatura de 45°C e 55°C, e liofilizados e armazenados em temperatura ambiente e em congelamento;

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Materiais.

Os reagentes utilizados neste trabalho e seus fornecedores encontram-se listados na **tabela 5**.

Tabela 5: Reagentes e seus respectivos fornecedores utilizados neste trabalho.

Reagente	Fornecedor
Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)	Proquímicos
Ácido acético	Merck
Ácido bórico	Reagen
Ácido cítrico	Synth
Ácido fosfórico	Merck
Ágar	Vetec
Agar Batata Dextrose (PDA)	Kasvi
Citrato de sódio	Proquímicos
Fosfato de sódio monobásico	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	Vetec
Glicina	Synth
Hidróxido de sódio	Merck
Locustbean gum (LBG)	Sigma
Tween 80	Sigma

4.2 Métodos.

O fluxograma descrito na **figura 6** representa o esquema simplificados das etapas desenvolvidas neste trabalho.

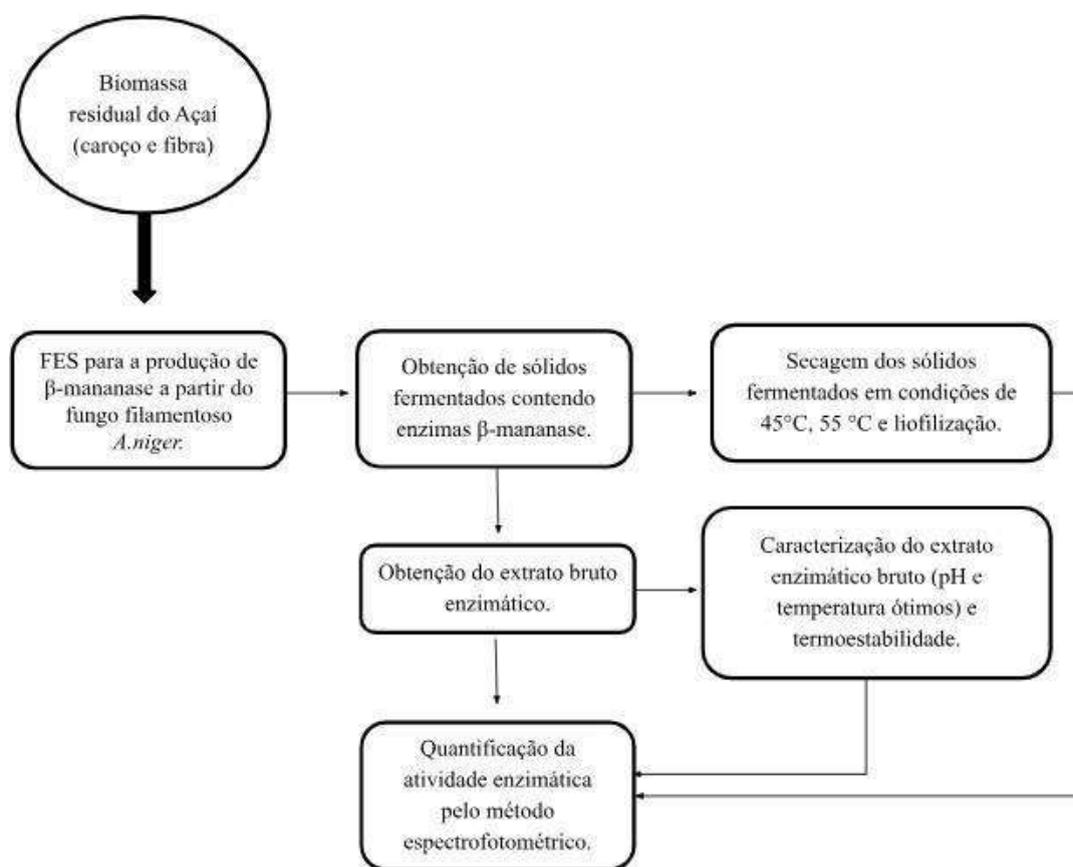


Figura 6: Fluxograma representado as etapas do estudo.

4.2.1 Coleta e preparo da biomassa residual do açaí.

A biomassa residual do açaí foi coletada em Belém, capital do estado do Pará, no Brasil. As amostras foram secas à temperatura ambiente durante 2 dias, moídas em triturador forrageiro TRAPP modelo TRF – 80 Júnior, armazenadas em recipientes plásticos com vedação. Posteriormente, caroço e fibra foram separados manualmente, desta vez apenas o caroço passou pelo processo de moagem executada por moinho de facas tipo Wyllie TE-650. Os caroços moídos pelo moinho de facas e a fibra separadamente passaram pelo processo de peneiramento em peneiras granulométricas (marca Bertel, mesh 14), obtendo-se amostras com tamanho de partícula menor que 1,18 mm (**Figura 7**). Por fim, os componentes majoritários dessa biomassa – caroço e fibra – foram devidamente armazenados para posterior uso no processo de fermentação em estado sólido.



Figura 7:A) Caroço de açai utilizado neste trabalho. B) Fibra de açai utilizado neste trabalho. Fonte: De autoria própria.

4.3 Crescimento fúngico.

O fungo filamentososo *Aspergillus niger* isolado a partir do grão de café (MAYRINCK 2014), (Sisgen n° A6DAD76) foi utilizado para a obtenção do inóculo para fermentação em estado sólido, para isso foi utilizada a suspensão de esporos obtida a partir da raspagem dos fungos crescidos em tubo inclinado contendo ágar batata dextrose (PDA) a 30°C durante 7 dias. Após o crescimento em tubo, os esporos foram raspados com o auxílio da alça microbiológica e suspensos em 10 mL de uma solução tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) e 0,1% (v/v) de Polissorbato de sódio (Tween 80). Em seguida, uma alíquota de 2,0 mL da solução obtida com esporos foi inoculada em erlenmeyer (500mL), contendo 60 mL de meio de crescimento sólido, composto por 2% (m/v) de ágar bacteriológico e Agar Batata Dextrose (PDA), na concentração de 39g/L, descrito no rótulo do próprio reagente. Estes foram incubados a 30°C durante 7 dias. Com o uso de 40 mL de água destilada foi realizada a obtenção da suspensão de esporos utilizada como inóculo da FES. A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer através de microscopia óptica.

4.4 Fermentação em estado sólido.

A fermentação em estado sólido foi realizada utilizando 3 gramas da biomassa residual do açai (90% do caroço e 10% da fibra) com umidade inicial de 60%. A biomassa foi suplementada com solução nutritiva contendo Glicina (ácido aminoacético), na razão 50:4

(Carbono:Nitrogênio), conforme descrito por SILVA (2022). A FES foi realizada em biorreator do tipo bandeja (béquer de 50 mL) com a concentração do inóculo de 1×10^8 esporos por grama de massa seca. O processo fermentativo foi conduzido em câmara climática, da marca Visomes Plus, durante 168 horas, com temperatura de 30°C e 90% de umidade relativa do ar, conforme descrito por SILVA (2022). O resíduo fermentado foi homogeneizado e alíquotas foram retiradas para a análise de pH, umidade e atividade enzimática do extrato bruto obtido.

4.5 Análise de umidade e pH.

O teor de umidade foi determinado utilizando a balança de umidade modelo MOC-63U da marca Shimadzu, onde foi inserido 1 g do resíduo fermentado a uma temperatura de secagem de 105°C. Para determinar o pH final da fermentação, foi utilizado 0,5 g do meio fermentado juntamente com 5,0 mL de água destilada agitados por 3 minutos em vórtex. O pH do sobrenadante foi medido utilizando pHmetro, calibrado com soluções tampão 4 e 7, com eletrodo da Biovera Sensoglass, modelo SP 1800.

4.6 Extração das Enzimas.

Para obtenção do extrato enzimático foi adicionado ao material fermentado, tampão citrato de sódio 50 mM à pH 5,0 utilizando a proporção de 1:8 (m/v), ou seja, 8 mL de solução tampão para cada grama de massa seca, havendo ainda a adição de polissorbato de sódio (Tween 80) conforme definido por SILVA (2018). O material foi incubado a 200 rpm a 30°C por 20 minutos em incubadora rotatória, sendo então prensado manualmente. O extrato enzimático bruto obtido foi centrifugado a 4.000 rpm x g por 5 minutos, sendo o sobrenadante empregado para as análises da atividade enzimática. Após as análises realizadas para o DCCR, o tampão utilizado para extração enzimática foi redefinido para tampão citrato de sódio 50 mM à pH 6,0.

4.7 Caracterização do extrato enzimático bruto.

4.7.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade β -mananásica

Para o estudo do pH e da temperatura ótimos de atuação da β -mananase inicialmente foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR). Foram definidas faixas de análise para ambas as variáveis, para avaliar a atividade enzimática em diferentes condições de pH e temperatura, conforme a **tabela 6**. A atividade enzimática foi realizada conforme descrito no item 4.7.2 empregando as diferentes condições de pH e temperatura do DCCR. A análise

dos resultados foi realizada utilizando o software Statistica 7.0, considerando o nível de significância de 5%. Posteriormente foi avaliada a atividade em pH 6,0 e temperaturas de 64 a 100 °C.

Tabela 6: Níveis reais e codificados (pH e temperatura) para o DCCR.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	4,6	5,0	6,0	7,0	7,4
Temperatura	36 °C	40°C	50°C	60 °C	64 °C

4.7.2 Quantificação da atividade enzimática da β -mananase.

A quantificação da atividade mananásica foi realizada de acordo com o método descrito por Rättö e Poutanen (1988), sendo aplicado como substrato a goma alfarroba 0,5% (LBG), rica em galactomananas, com adição de tampão citrato 0,05M a pH 5,0. Para avaliar a reação enzimática, em eppendorfs (2mL), foram adicionadas alíquotas de 150 μ l do substrato com 150 μ l do extrato enzimático diluído em solução tampão. No controle do substrato, foi utilizado 150 μ l de substrato com 150 μ l de tampão, e o controle da enzima foi realizado utilizando 150 μ l do extrato enzimático diluído com 150 μ l de tampão, no caso das análises realizadas para o DCCR o pH variou entre 4,6 e 7,4. As amostras foram incubadas em água a 60 °C em tempo fixo de 10 minutos, no caso das análises realizadas para o DCCR a temperatura de incubação variou entre 36°C e 64°C. A reação foi paralisada por banho de ebulição (100°C), por 5 minutos. Os açúcares redutores liberados foram quantificados usando o método de Miller (1959), sendo utilizado 300 μ l de 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em cada meio reacional, sendo em seguida colocados em banho de ebulição (100°C) por 15 minutos. Por fim, a reação foi interrompida com a adição de 900 μ l de água destilada, após a homogeneização, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda na faixa de 540 nm. Os resultados foram obtidos utilizando as equações 1 e 2, expressos em U/mL e U/g, que é definido como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de açúcares redutores totais por minuto em condições experimentais.

Equação1: Equação para obtenção da atividade enzimática (U/mL)

$$A_e = \frac{(\alpha(Abs_{amostra} - Abs_{ce}) \times diluição) - Abs_{cs}}{T \times V_e}$$

Onde:

A_e - Atividade enzimática ($U \cdot mL^{-1}$);

α - Fator da curva padrão;

Ab_{amostra} - Média das absorbâncias das amostras;

Ab_{SCE} - Média das absorbâncias do controle da enzima;

Ab_{SCS} - Média das absorbâncias do controle do substrato;

Diluição - Fator de diluição da amostra do extrato enzimático;

T - Tempo de reação (minutos);

V_e - Volume de extrato enzimático utilizado na análise (mL).

Equação2: Equação para obtenção da atividade enzimática (U/g)

$$A_E = \frac{A_e \times V_t}{M_t}$$

Onde:

A_E - Atividade enzimática ($U \cdot g^{-1}$);

V_t - Volume total de extrato enzimático (mL);

M_t - Massa seca inicial de meio (g).

4.7.3 Avaliação de termoestabilidade.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica da enzima mananase, o extrato enzimático bruto foi incubado em eppendorfs de 2mL, na ausência de substrato, em banho maria, condicionado a diferentes temperaturas (60°C , 65°C e 70°C). Posteriormente, alíquotas foram retiradas e utilizadas para determinar a atividade enzimática da β -mananase de forma periódica para a determinação de sua atividade enzimática através de ensaios enzimáticos descritos no item 4.7.2.

4.7.4 Avaliação de estocagem dos sólidos fermentados.

Os sólidos fermentados foram separados e submetidos ao processo de liofilização ou secagem em estufa. O processo de secagem em estufa ocorreu a 45°C e 55°C separadamente até alcançar aproximadamente 5% de umidade relativa. Após secagem ou liofilização, os materiais foram empacotados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente (30°C) e em congelamento (-15°C). Em seguida, foram realizadas extrações enzimáticas bem como análise

da atividade enzimática das seis condições estabelecidas durante um mês com espaçamento de uma semana entre as análises conforme descrito nos itens 4.5, 4.6 e 4.7.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade do extrato enzimático em diferentes condições de pH e temperatura.

A partir da fermentação em estado sólido (**figura 8**) foi possível obter o extrato enzimático rico em β -mananase utilizando o fungo filamentososo *Aspergillus niger* crescido em biomassa residual do açaí. Este resíduo foi selecionado como meio fermentativo, pois representa uma fonte renovável para a produção de enzimas e uma fonte indutora de baixo custo de manases, já que apresenta elevada concentração de mananas em sua composição e são gerados em grandes quantidades a partir do despulpamento do fruto. As condições de produção utilizadas foram determinadas em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (Silva, 2022). Após 168 horas de fermentação, o extrato enzimático bruto foi obtido e a atividade enzimática β -mananásica foi quantificada a fim de caracterizar sua atuação e avaliar seu potencial industrial.



Figura 8: Fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e a biomassa residual obtida do despulpamento do açaí (90% caroço e 10% fibra). De autoria própria.

Entretanto, investigar os inúmeros fatores que afetam os processos estudados, aplicando apenas os tradicionais métodos de tentativa e erro, torna-se uma tarefa complexa à medida que o custo da experimentação aumenta. Neste contexto, a metodologia do planejamento composto

central rotacional (DCCR) tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais, seu método consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas incluindo inúmeros fatores minimizando custos e tempos operacionais (MATTIETTO e MATTA, 2012). Em vista disso, com a finalidade de avaliar as melhores condições de atuação da mananase produzida, foram definidas duas variáveis para sua caracterização: pH e temperatura. Oito diferentes combinações dos níveis das duas variáveis independentes foram geradas pelo DCCR e foram realizadas três replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios. Portanto, a atividade enzimática foi quantificada em onze condições, variando o pH e a temperatura, conforme a **tabela 7**.

Tabela 7: Atividade β -mananásica para diferentes condições de pH e temperatura do delineamento composto central rotacional.

pH (valor codificado)	pH	Temperatura (valor codificado)	Temperatura (° C)	Atividade (U/g)
-1	5,0	-1	40	231,07
-1	5,0	1	60	308,51
1	7,0	-1	40	259,29
1	7,0	1	60	286,74
0	6,0	0	50	224,67
0	6,0	0	50	255,73
0	6,0	0	50	255,14
0	6,0	-1,41	36	197,60
0	6,0	1,41	64	373,90
-1,41	4,6	-1,41	50	244,67
1,41	7,4	0	50	284,41

Os dados apresentados na **tabela 7** foram utilizados para a análise do efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática obtida. A **tabela 8** apresenta os efeitos padronizados das variáveis (pH e temperatura) estudadas no planejamento, seus termos lineares e quadráticos bem como o efeito da interação entre as variáveis sobre a resposta da atividade enzimática.

Tabela 8: Tabela apresentando o efeito padronizado das variáveis temperatura e pH sobre a atividade enzimática e o grau de significância de cada parâmetro.

	Efeito	Erro padrão	t (5)	p
Média	245,19	15,48	15,82	0,000018
(1)T (°C)(L)	88,63	18,99	4,66	0,005508
T (°C)(Q)	38,82	22,67	1,71	0,147484
(2)pH (L)	15,66	18,99	0,82	0,447128
pH (Q)	17,48	22,67	0,77	0,475354
1L by 2L	-24,99	26,82	-0,93	0,394294

Para apresentar significância, uma variável precisa obter o valor de “p” no teste t de Student inferior ao valor de significância escolhido para avaliação, neste caso 5%. A variável pH, nos termos tanto linear quanto quadrático, bem como a interação entre pH e temperatura não apresentaram efeito significativo. Já a temperatura teve o termo linear significativo e positivo e o termo quadrático foi marginalmente significativo.

Para a construção do modelo, os parâmetros significativos e marginalmente significativos foram mantidos no modelo, estimando a atividade mananásica em função da variável temperatura (**equação 3**).

Equação 3: Modelo que retrata a atividade mananásica em função da variável temperatura

$$A = 253,4 + 44,4 \times T + 16,9 \times T^2$$

Onde:

A = Atividade mananásica (U/g)

T= temperatura nos valores codificados

A análise de variância (ANOVA) apresentou valor de p do modelo de 0,002704184 (menor que 0,05) indicando que a regressão é significativa e o modelo preditivo e que o modelo não tem falta de ajuste (p = 0,324910). O valor de R² foi de 0,77196 indicando que o modelo consegue explicar 77% da variação.

O gráfico de superfície gerado (**figura 9**) representa graficamente a relação entre a resposta estimada pelo modelo e duas variáveis independentes, exibindo a relação tridimensional em duas dimensões, com as variáveis independentes nos eixos x e y, e a variável

resposta (z) representada por uma superfície uniforme. O gráfico de superfície permite ver os valores estimados da resposta em toda faixa de estudo das variáveis independentes.

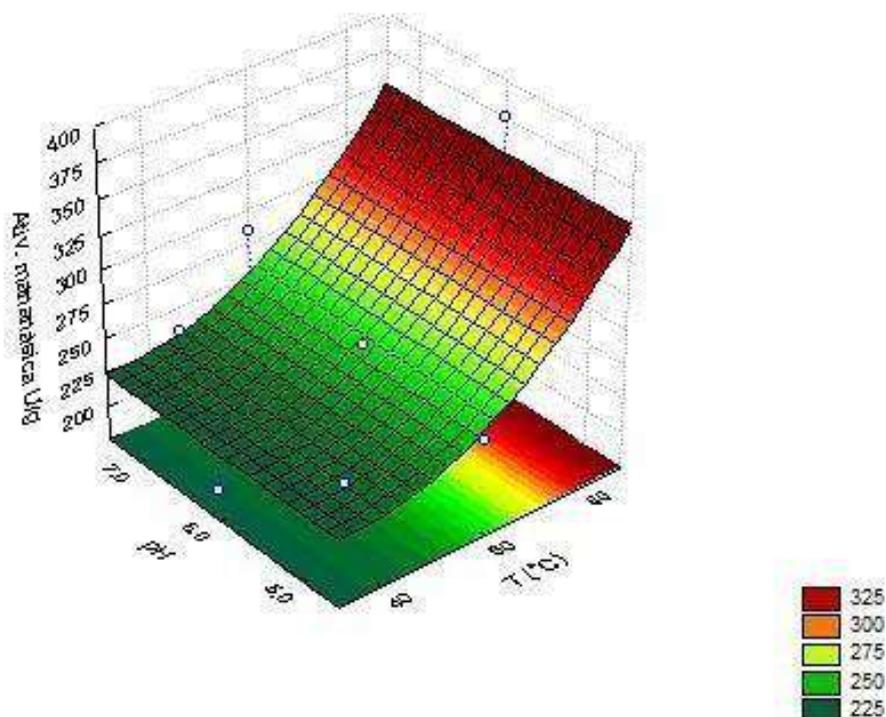


Figura 9: Representação das melhores condições (pH e temperatura) de atuação da β -mananase através do gráfico de superfície de resposta.

Tendo em vista que o pH em seus termos lineares, quadráticos e de interação com a temperatura não foram estatisticamente significativos, o gráfico de superfície de resposta (**figura 9**), não apresenta variação de pH em toda faixa estudada, já a variação de temperatura apresentou efeito linear positivo na atividade da β -mananase. O termo quadrático da temperatura foi significativo, mas define uma região de mínimo de resposta, região destacada em verde, que se refere as condições em que a enzima apresentou menor atividade enzimática, neste caso, em temperaturas mais baixas. Por outro lado, a região em vermelho representa as condições referentes a atividade máxima da enzima, representando maiores temperaturas. Esta região do gráfico tem um comportamento linear indicando que temperaturas maiores poderiam causar aumento da atividade da mananase.

Por meio dos resultados obtidos através do gráfico de superfície de resposta, foi determinada a próxima etapa que consistiu em ampliar a faixa de caracterização do extrato enzimático, fixando o pH em 6,0 e elevando a temperatura de análise, a fim de avaliar se a

condição ótima de atuação da enzima havia sido atingida ou se teria capacidade de apresentar uma atividade maior em temperaturas mais elevadas.

Os resultados (**figura 10**) indicam que a atividade enzimática foi mantida em valores máximos até 85°C, além disso se manteve acima de 50% da sua capacidade máximo de atuação quando avaliada a 88°C. Apesar da redução da atividade enzimática, o extrato bruto enzimático obtido ainda apresenta ação quando avaliada nas temperaturas de 91°C, 94°C, 97°C e 100°C.

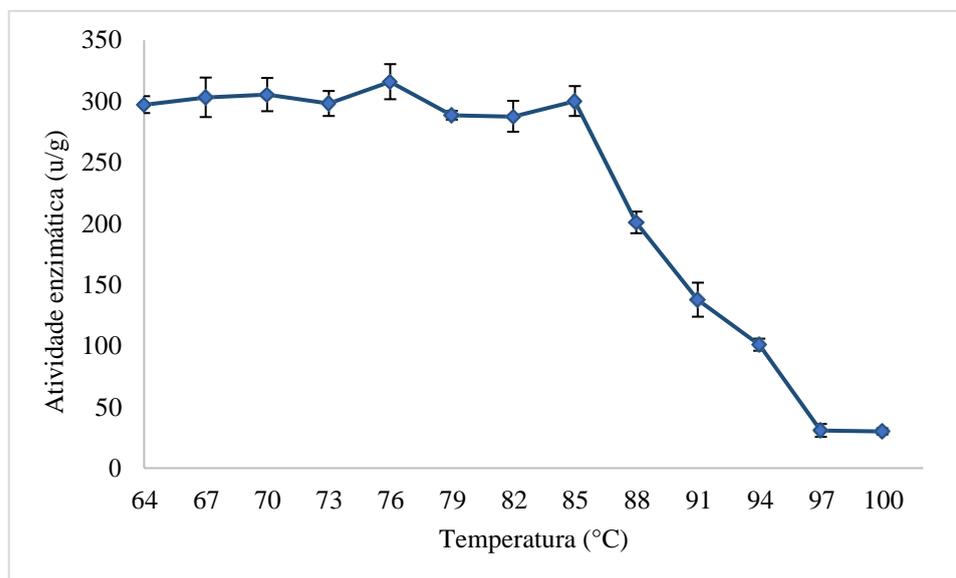


Figura 10: Atividade enzimática obtida em variação de temperatura e em pH 6,0.

No estudo do DCCR a atividade máxima da mananase do fungo *A. niger* foi de 373,90 U/g ou 46,73 U/mL, em pH 6,0 e 64°C. A análise de atividade enzimática obtida em variação da temperatura em pH fixado em 6,0 apresentou faixa de temperatura ótima de 64°C a 85°C. A atividade enzimática relatada neste estudo é superior a atividade relatada por Silva (2018) que obteve 42,3 U/g em pH=4,6 e 60°C aplicando o fungo *Penicillium citrinum* em FES na biomassa residual do açaí (90% caroço e 10% fibra) a 30°C e adição de solução nutritiva contendo peptona. Cabe destacar que a atividade enzimática da enzima obtida neste estudo quando avaliada a 100°C apresentou atividade de 30 U/g, valor relativamente próximo ao obtido por Silva (2018) em ensaios a 60°C.

Os resultados relacionados à caracterização obtidos até aqui se assemelham aos dados encontrados na literatura, que indicam uma tendência para faixas ótimas de atuação das mananases, produzidas por fungos em condições ácidas a neutro e em temperaturas mais elevadas, na faixa entre 40°C e 80°C, conforme apresentado na **tabela 4** da seção 2.8 deste

trabalho. Essa característica da mananase obtida é adequada para diversas aplicações biotecnológicas, visto que apresentou capacidade de atuação em altas temperaturas e em toda faixa de pH estudado.

5.2 Termoestabilidade da β -mananase.

A termoestabilidade é um dos principais fatores estudados quando se tem interesse na utilização de enzimas em processos industriais, principalmente processos mais longos, seu estudo pode indicar condições de aplicação e fornecer informações sobre a estrutura e função da enzima (Silva, 2018). Considerando que foi possível obter elevadas atividades enzimáticas até 85°C utilizando o extrato bruto de *A. niger*, o estudo de sua estabilidade se tornou um fator a ser avaliado, para isso foram realizados ensaios a temperatura de 60°C, 65°C e 70°C, em pH 6,0.

Uma vez que as condições que permitiram a maior atuação da enzima dentre os valores estudados no planejamento utilizando o delineamento composto central rotacional foi a 64°C e pH=6, a avaliação da termoestabilidade foi iniciada a 60°C em pH=6. O resultado (**figura 11**) comprova que houve a perda de 15% na atividade enzimática quando incubada durante uma hora a 60°C, porém mesmo após 168 horas a enzima ainda apresenta mais de 80% da atividade inicial. Outrossim, a sua atividade se manteve acima de 65% após 264 horas (11 dias) de incubação a 60°C.

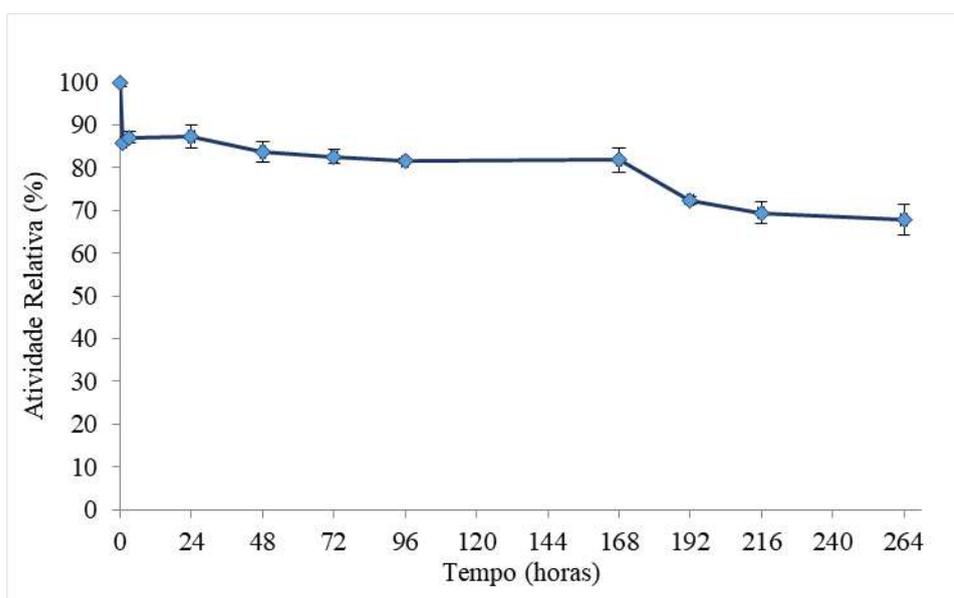


Figura 11: Termoestabilidade da β -mananase produzida por FES em biomassa residual de açaí presente no extrato bruto a 60 °C, pH 6,0.

Em vista disso, a temperatura de incubação do extrato enzimático foi ajustada para 65°C com o objetivo de avaliar sua estabilidade. A **figura 12** comprova que ocorreu a redução de aproximadamente 15% da capacidade de atividade relativa nos primeiros 30 minutos de incubação, entretanto a atividade enzimática se manteve acima de 80% até quatro horas, a enzima apresentou também mais de 50% de sua capacidade após 48 horas de exposição a 65°C. Após 72, 96 e 168 horas de incubação, a enzima ainda apresentou atividade relativa de 49,06%, 31,23% e 18,89% respectivamente.

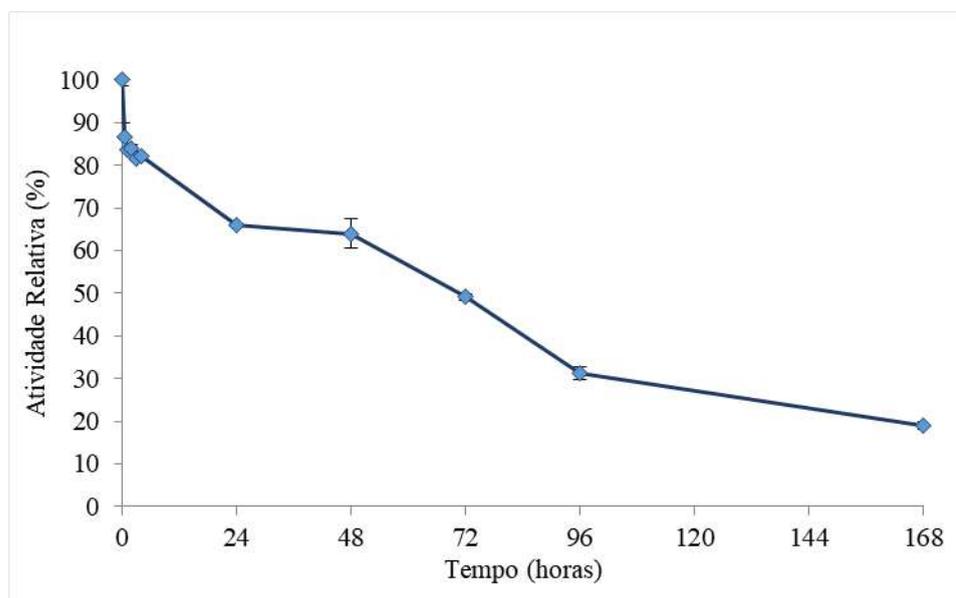


Figura 12: Termostabilidade da β -mananase produzida por FES em biomassa residual de açaí presente no extrato bruto a 65 °C, pH 6,0.

O estudo de termostabilidade também foi realizado a 70°C com o objetivo de avaliar o tempo de reação máximo que poderia ser aplicado nesta condição. Na **figura 13** é possível observar que a atividade enzimática após 30 minutos de incubação foi de 82% quando comparada a atividade inicial, havendo a redução para 72,14% após uma hora de estocagem a 70°C. Contudo, após duas e três horas, a enzima apresentou 32,34% e 32,40% de atividade relativa, a atividade relativa da enzima decaiu para menos de 50% antes de completar duas horas de incubação.

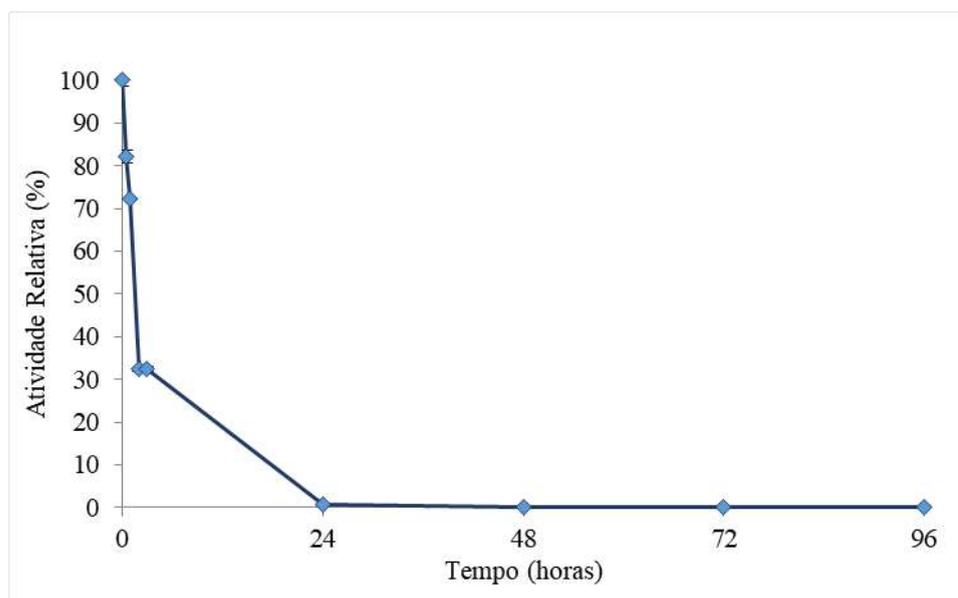


Figura 13: Termostabilidade da β -mananase produzida por FES em biomassa residual de açaí presente no extrato bruto a 70 °C, pH 6,0.

Os resultados de termostabilidade obtidos neste estudo são promissores visto que foram obtidos sem formulação com estabilizantes ou adjuvantes. Além disso, utilizando apenas o extrato bruto, a enzima β -mananase produzida apresentou maior atividade em pH 6,0 e temperatura entre 60 e 85°C e maior estabilidade à 60°C. Estes dados mostram que a enzima pode ser utilizada a 60°C até 264 horas após a exposição mantendo sua atividade relativa acima de 65%. Ademais, pode ser empregue a 65°C até 72 horas de reação mantendo atividade relativa superior a 50% e em 70°C em reações de até 4 horas, em processos que priorizam temperatura mais elevada.

Segundo o levantamento realizado por Srivastava e Kapoor (2017), vários estudos sobre *endo* - β -mananase indicam que interações moleculares como pontes de dissulfeto, ligação de hidrogênio e características estruturais como sítio de ligação de metal com afinidade para íons metálicos bivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , sequências de ligação ricas em repetições de treonina (Thr)/ serina (Ser) desempenham um papel significativo na estabilidade térmica da *endo* - β -mananase.

Pesquisas recentes também sugerem que os módulos de ligação de carboidratos não catalíticos (CBMs) também funcionam de maneira não convencional em relação à estabilidade térmica da *endo* - β -mananase. O posicionamento do domínio CBM em relação ao domínio catalítico afeta a sensibilidade térmica, a deleção do domínio CBM 27 da β -mananase de *T. petrofila* levou à redução no ponto médio da desnaturação da enzima de 100°C para 88°C. As

sequências de ligação entre o domínio catalítico e o CBM também influenciam para a termoestabilidade das *endo*- β -mananases isso porque CBMs funcionam como domínios termoestabilizadores, como é evidente em muitas *endo*- β -mananases, mas as funções de estabilização térmica de CBM ainda permanecem altamente intrigantes (DOS SANTOS et al., 2012; SRIVASTAVA e KAPOOR; 2017).

Estudos disponíveis na literatura relatam termoestabilidade menor do que o obtido neste estudo. As enzimas β -mananase obtidas por Lima *et al.*, (2021) por meio do fungo *P. citrinum* em FES exibiram boa estabilidade térmica limitada a 5 horas de incubação a 40°C, 50°C e 60°C, retendo 90%, 55% e 60% da atividade inicial, respectivamente. A caracterização apresentada por Infante (2019) aponta que a atividade mananásica do fungo *T. pinophilus* foi ativa quando o extrato bruto extracelular foi incubado nas temperaturas de 40°C e 50°C durante 180 minutos, e a 60°C durante 30 minutos, quando incubado na temperatura de 70°C, apenas 50% da atividade foi obtida após 60 minutos. Além disso, o fungo *A. clavatus* apresentou ativação da atividade de mananase nas temperaturas de 40°C a 60°C somente por 10 minutos, e perdeu 50% da atividade quando incubado a 70°C após 10 minutos. Já Norita, Rosfarizan e Ariff (2010) relatam a produção de β -mananases de *A. niger* com meia-vida de apenas 6 horas a 60°C. Endo- β -1,4 mananases produzidas a partir de *A. niger gr* e *A. flavus gr* relatado por Kote, Patil e Mulimani (2009) apresentaram termoestabilidade na ausência de quaisquer estabilizadores (mantendo 50% da atividade residual por 8 e 6 h, respectivamente, a 60 °C).

A termoestabilidade se tornou objeto de pesquisa pois representa uma propriedade das enzimas utilizadas em processos biotecnológicos. No entanto, a maioria dos trabalhos avalia a estabilidade das β -mananases obtidas em apenas poucas horas de incubação (15 min a 8 horas) conforme apresentado na **tabela 4**, sendo importante também avaliar a termoestabilidade em tempos maiores visando aplicações em reações mais longas ou em que o reuso da enzima seja desejável. Em ensaios de hidrólise, por exemplo, enzimas termoestáveis apresentam vantagens como maior atividade específica diminuindo a quantidade de enzimas, maior estabilidade permitindo melhor desempenho de hidrólise e maior flexibilidade em relação às configurações do processo, levando a economia geral do processo (VIAKARI et al., 2007). Um exemplo de utilização da mananase obtida neste estudo é sua aplicação em hidrólise do extrato de café, o principal resíduo produzido durante a produção do café solúvel é a borra de café residual que apresenta pH aproximado de 5 e consiste principalmente de polissacarídeos como galactomanana e celulose que não são solubilizados durante o processo de extração e, por isso,

permanecem como sólidos insolúveis. Em vista disso, a aplicação de β -mananase é vista como uma estratégia favorável para solubilizar/catalisar a hidrólise dos sólidos remanescentes, aumentando assim os rendimentos de sólidos solúveis do café solúvel. O estudo realizado por Baraldi e colaboradores (2016) demonstra que após o café ser torrado e extraído, a borra é então processada por hidrólise enzimática a 50°C gerando um café solúvel com baixa quantidade de compostos indesejados como furfural, acetaldeído e 5-HMF, além de consumir menos energia no processo.

Com o objetivo de avaliar a melhor forma de estocagem das mananases produzidas por FES, foi estudado a estabilidade dos sólidos fermentados após o processo de secagem em estufa e liofilização.

5.3 Estabilidade de estocagem do preparado enzimático sólido (PES) contendo a enzima β -mananase.

Os sólidos fermentados obtidos após a fermentação por *A. niger* foram submetidos a secagem em estufa nas temperaturas de 45°C e 55°C e ao processo de liofilização, a quantificação da atividade enzimática foi realizada a 60°C, temperatura de melhor estabilidade térmica, conforme demonstrado anteriormente. É possível observar na **figura 14** a atividade residual em porcentagem adquirida antes e depois dos processos.

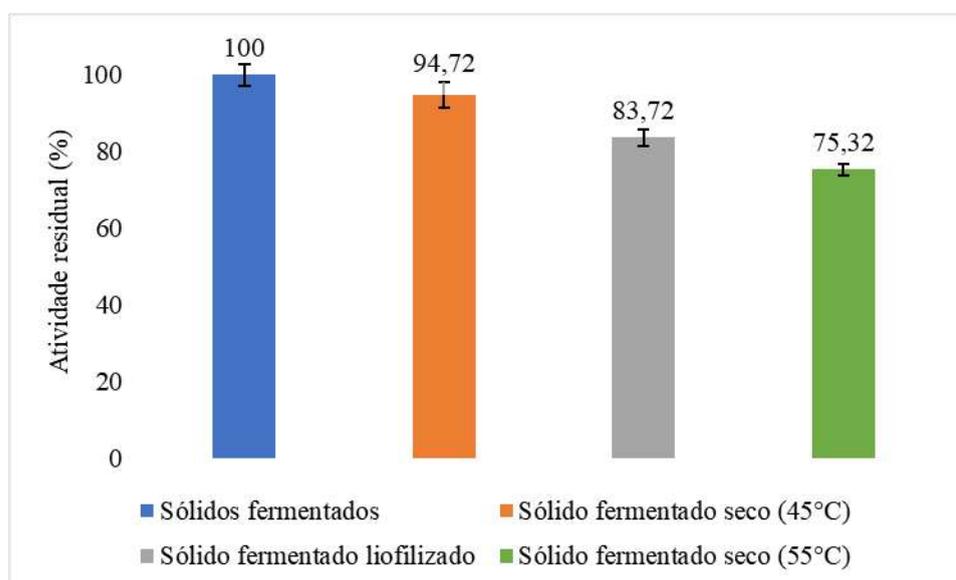


Figura 14: Atividade residual obtida da enzima β -mananase adquirida antes e depois dos processos de secagem e liofilização dos sólidos fermentados obtidos por FES em biomassa residual de açúcar.

A atividade enzimática obtida após o tratamento a 45°C se manteve próxima ao que foi observado no extrato enzimático bruto sem tratamento. Quando submetido a 55°C, a atividade mananásica obtida apresentou um rendimento aproximado de 75%, isso indica que os sólidos fermentados secos em temperaturas mais baixas possuem capacidade de manter o rendimento enzimático próximo aos obtidos em fermentados sólidos não secos, isso porque o longo período de exposição do material a altas temperaturas pode ter causado a perda parcial de atividade enzimática. Ao passar pelo processo de liofilização, a atividade enzimática obtida se manteve acima de 80%, rendimento superior ao obtido após secagem a 55°C. Um dos fatores que podem estar associado a redução de atividade gerada pelos sólidos fermentados liofilizados foi o método de congelamento, neste estudo a metodologia aplicada foi o congelamento em congelador (freezer), entretanto conforme relatado por De Jesus e Maciel Filho (2014) o método de congelamento influencia na qualidade do produto final após o processo de liofilização, sendo o congelamento com nitrogênio líquido considerado o mais adequado no caso de algumas enzimas. Os parâmetros de processamento da secagem como taxa de secagem, tempo, temperaturas e outros fatores influenciam as tensões de secagem e, portanto, quanta degradação ocorre durante a secagem (MENSINK et al., 2017).

Ainda de acordo com Mensink e colaboradores (2017) quando várias enzimas industriais foram secas por meio da liofilização sem estabilizadores, a secagem abaixo de aproximadamente 10% de teor de água resultou em perda completa de funcionalidade. Todavia, neste estudo apesar da secagem dos sólidos terem ocorrido abaixo de 10% de teor de água, a atividade se manteve acima de 75%, mostrando uma boa estabilidade destas enzimas frente as condições de secagem sem estabilizadores.

Após o processo de secagem, os sólidos fermentados foram alocados em condições ambiente e em congelamento para avaliação de estabilidade enzimática obtida. A atividade relativa obtida pela enzima presente nos sólidos fermentados seco a 45 °C quando armazenado a temperatura ambiente e em congelamento está representada na **figura 15**.

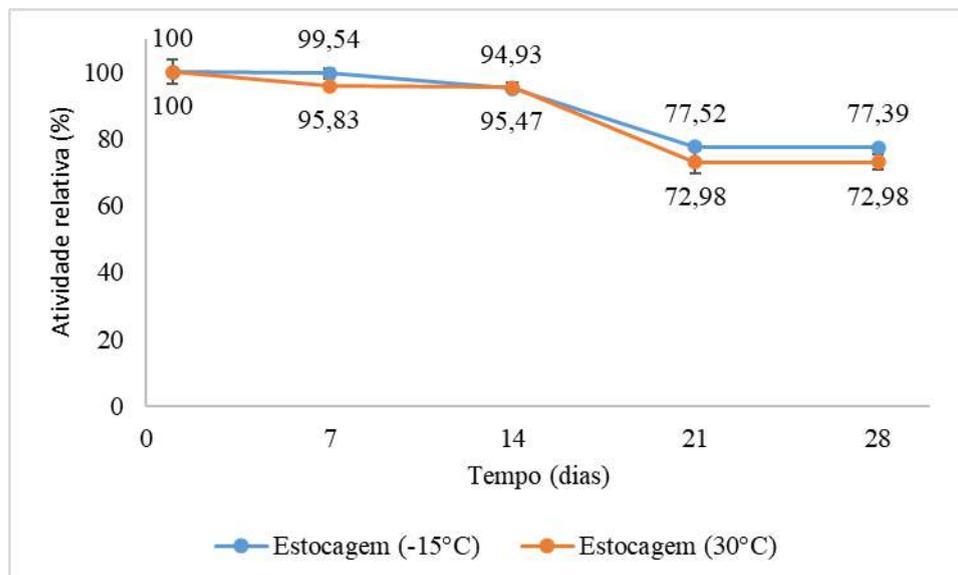


Figura 15: Atividade relativa obtida da enzima β -mananase após o processo de secagem a 45°C dos sólidos fermentados estocados a 30°C e -15°C obtidos por FES em biomassa residual de açaí.

Os dados obtidos mostram que a atividade relativa enzimática a 45°C quando congelado apresentou após uma semana 99,54% de atividade relativa comparada a atividade obtida antes do armazenamento, valor superior ao apresentado quando estocado em temperatura ambiente (95,83%). Após duas semanas, ambas as amostras apresentaram atividades semelhantes com variação menor do que 1%. A atividade relativa após três e quatro semanas reduziu para a faixa de 70% nos dois casos, mas o resultado ainda se mostra promissor pois a capacidade de atuação da enzima permaneceu superior a 50% do seu potencial enzimático.

Os sólidos fermentados e secos a 55°C quando armazenados em 30°C e -15°C, apresentaram comportamentos semelhantes durante duas semanas de estocagem. A **figura 16** demonstra que após duas semanas em estocagem em meio ambiente, houve queda de apenas 10% da atividade relativa enzimática quando estocado a 55°C, após três semanas a enzima obtida ainda apresentou mais de 65% de sua capacidade de atuação variando menos de 1% do valor obtido após um mês.

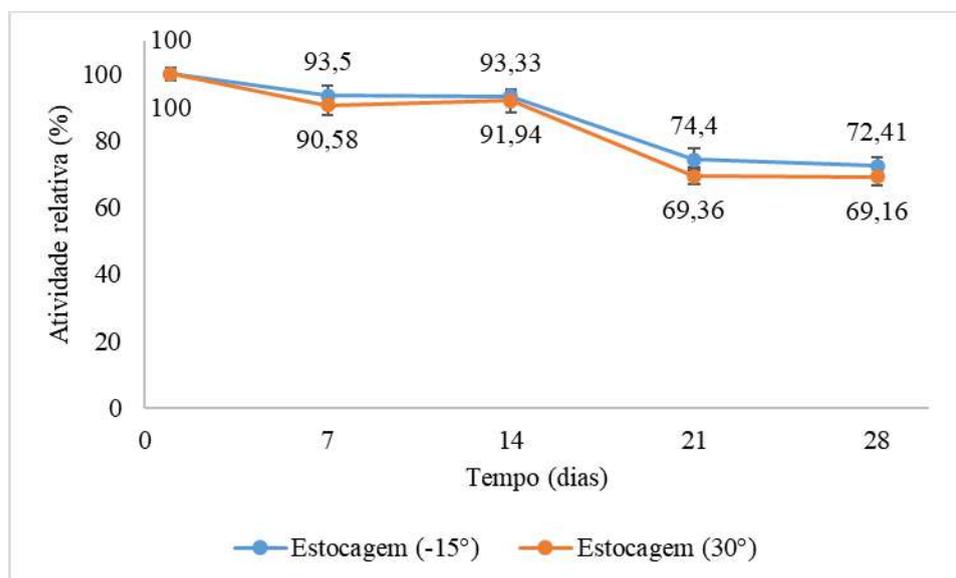


Figura 16: Atividade relativa obtida da enzima β -mananase após o processo de secagem a 55°C dos sólidos fermentados estocados a 30°C e -15°C obtidos por FES em biomassa residual de açáí

A resposta obtida da extração dos sólidos fermentados seco a 55°C e armazenados em congelador (**figura 16**) foi superior a obtida quando estocados em temperatura ambiente. A enzima apresentou uma perda inferior a 7% mesmo após duas semanas de congelamento. Além disso, após três e quatro semanas, a enzima ainda manteve mais de 70% de sua capacidade, apresentando assim um comportamento semelhante ao observado quando estocado a 45°C.

Quando liofilizados e armazenados em temperatura ambiente (**figura 17**), a atividade relativa apresentou o rendimento acima de 80% em até 15 dias. Contudo, após três e quatro semanas, a atividade relativa decaiu para 48,96 e 49,47% respectivamente, apresentando uma atuação inferior aos obtidos pelos sólidos fermentados secos a 45°C e 55°C, tanto armazenados em temperatura ambiente quanto em congelamento.

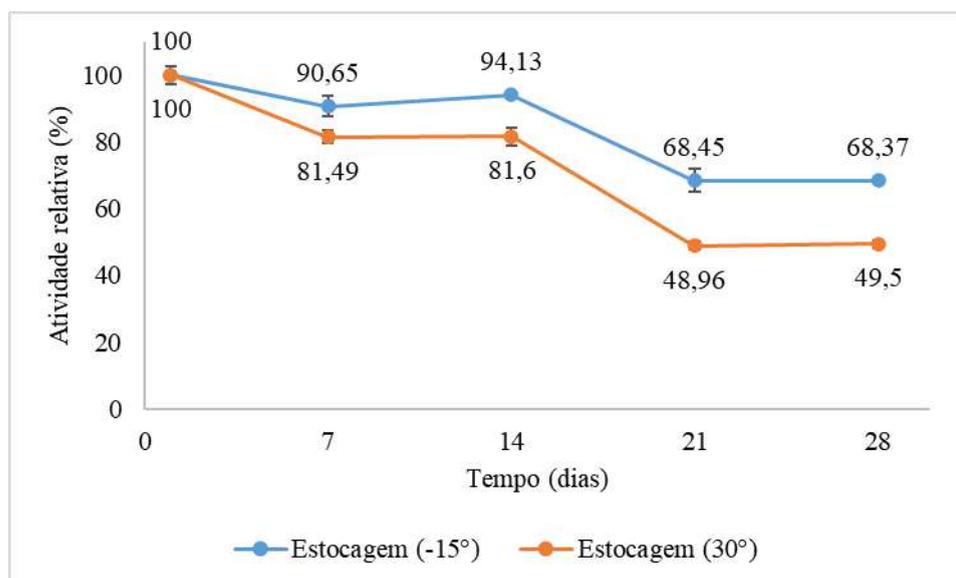


Figura 17: Atividade relativa obtida da enzima β -mananase adquirida após o processo de liofilização dos sólidos fermentados estocados a 30°C e -15°C obtidos por FES em biomassa residual de açaí.

Os sólidos fermentados liofilizados que foram estocados a -15°C apresentaram atividade relativa enzimática superior a 90% mesmo após duas semanas em armazenamento. Seu comportamento se manteve na faixa de 68% mesmo após quatro semanas em estocagem (**figura 17**), resultados semelhantes ao obtido quando os sólidos fermentados foram submetidos a secagem a 55°C e armazenados em temperatura ambiente.

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir os sólidos fermentados ao passarem pelo processo de secagem (45°C e 55°C) e liofilização apresentaram atividades relativas altas, principalmente com a secagem a temperatura de 45°C. Os processos de secagem a 45 e 55 °C também foram capazes de manter valores de atividade relativa consideráveis com 28 dias de estocagem mesmo mantidos a temperatura ambiente, indicando que a estocagem em congelamento não seria necessária e poderia reduzir os custos do processo. A utilização da secagem em estufa a 45°C se mostra como uma metodologia promissora quando comparado com outros processos como liofilização que exige tempo de processo, maior investimento em equipamentos e alto consumo de energia podendo ser considerados como fatores limitantes na escolha de uma técnica (DE JESUS e MACIEL FILHO, 2014).

A estabilidade da enzima pode estar associada á presença de oligo/monossacarídeos na biomassa fermentada. Os açúcares, especialmente os dissacarídeos, podem atuar preservando as proteínas nativas durante o processo de secagem e armazenamento, seja por impedir a mobilidade molecular (teoria da vitrificação) ou por preservar sua conformação nativa pela

substituição das pontes de hidrogênio (teoria da reposição de água), essas teorias existem há várias décadas e têm sido amplamente discutidas na literatura (LIMA et al.,2021; MENSINK et al., 2017).

Para um melhor entendimento, uma das estratégias foi avaliar os valores de pH e umidade obtidos dos sólidos fermentados secos. A **figura 18** e **figura 19** apresentam os resultados obtidos das análises de umidade final e pH final obtido após secagem em 45°C e 55°C, respectivamente e armazenamento dos fermentados sólidos em temperatura ambiente.

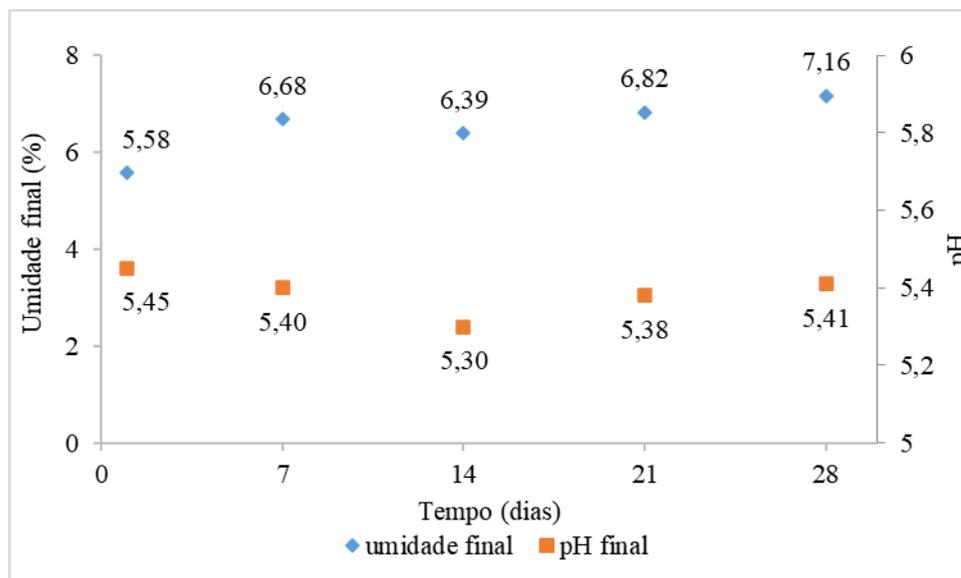


Figura 18: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (45°C) e estocados (30°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.

Os resultados obtidos mostram que a variação observada no pH final dos sólidos fermentados estocados em temperatura ambiente foram mínimas tanto os secos a 45°C (**Figura 18**) quanto os secos a 55°C (**Figura 19**), sendo um indicativo de que a variação do pH não está relacionada com a perda da atividade enzimática, já que esta variável não apresentou alteração significativa. Mas, a avaliação da umidade final obtida após a estocagem em ambos os casos apresenta um pequeno aumento, podendo ser um dos fatores correlacionados a perda da atividade relativa obtida. Ao lado da temperatura, a umidade geralmente tem um grande impacto na estabilidade da proteína no estado seco, visto que diferentes proteínas possuem diferentes características físico-químicas e, portanto, diferentes modos de degradação. Em vista disso, não pode se afirmar uma previsão generalizada de como exatamente a umidade afeta as taxas de degradação de proteínas (MENSINK et al., 2017).

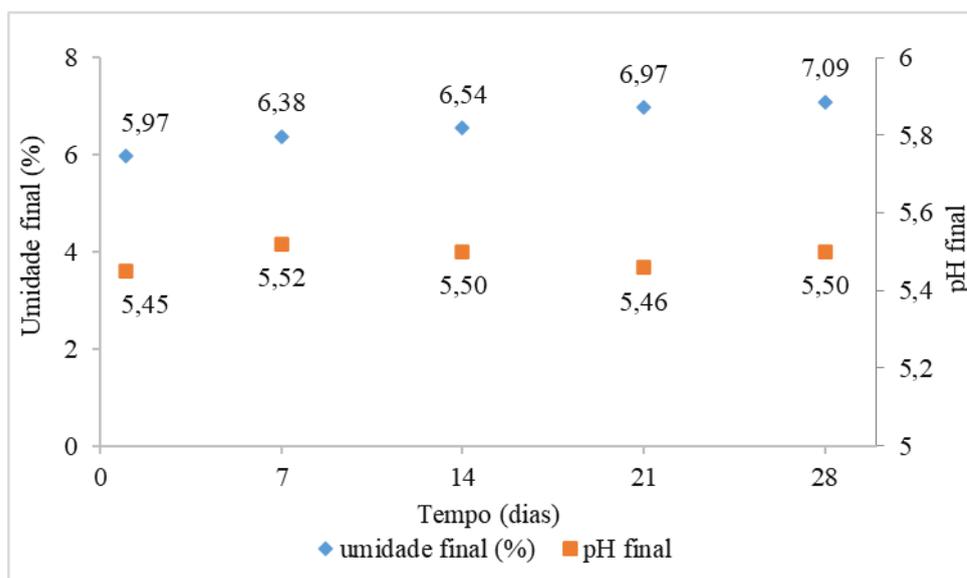


Figura 19: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (55°C) e estocados (30°C) obtidos por FES em biomassa residual de açai.

O mesmo comportamento no resultado do pH final foi obtido quando os sólidos fermentados submetidos a secagem (45° e 55°) foram estocados a -15°C, a **figura 20 e figura 21** apresentam graficamente os resultados obtidos evidenciando a pouca variação de pH.

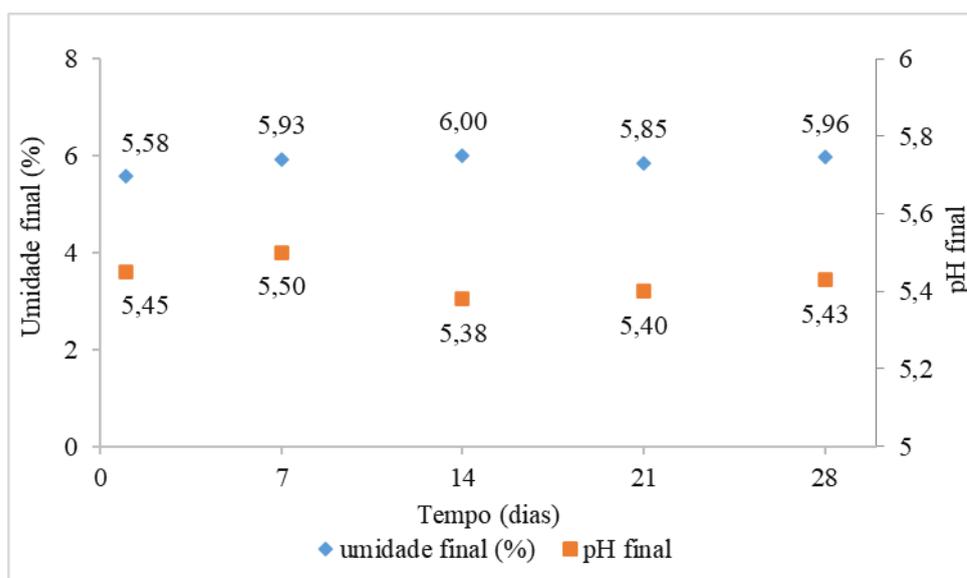


Figura 20: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (45°C) e estocados (-15°C) obtidos por FES em biomassa residual de açai.

Por outro lado, ao contrário do que foi observado em armazenamento em 30°C, a umidade final apresentou variações inferiores, sendo um dos indicativos associados à manutenção da estabilidade da enzima presente nos sólidos fermentados e conseqüentemente

maior atividade relativa obtida quando armazenados em congelamento do que em temperatura ambiente.

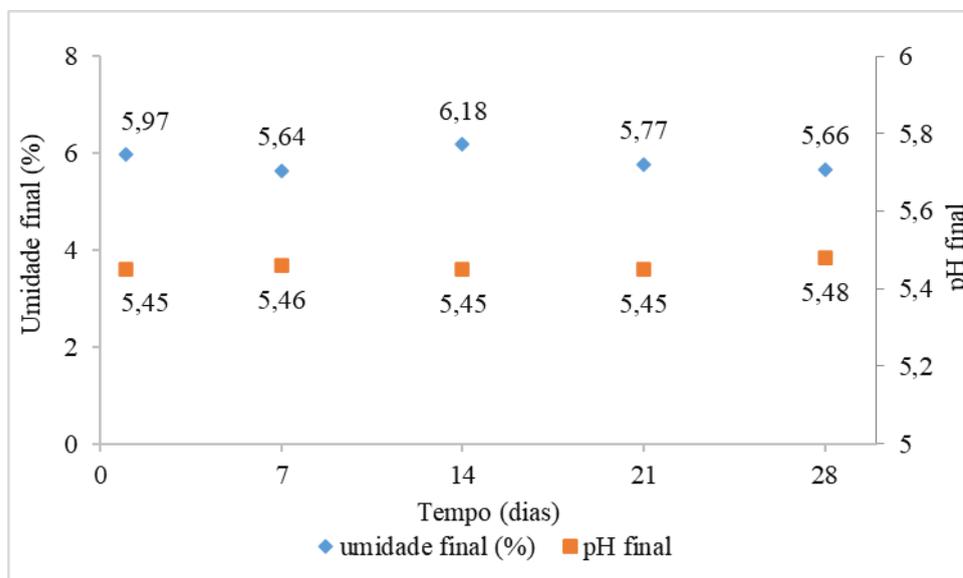


Figura 21: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados secos (55°C) e estocados (-15°C) obtidos por FES em biomassa residual de açaí.

A liofilização é um processo diferenciado de secagem, já que ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelado passe diretamente ao estado gasoso, proporcionando a mudança de estado físico por sublimação, com o objetivo de estabilizar produtos através da diminuição da atividade de água (YAMAGUCHI e al., 2017). No caso do material liofilizado foi avaliado apenas a variação do pH dos sólidos fermentados e submetidos ao processo de liofilização.

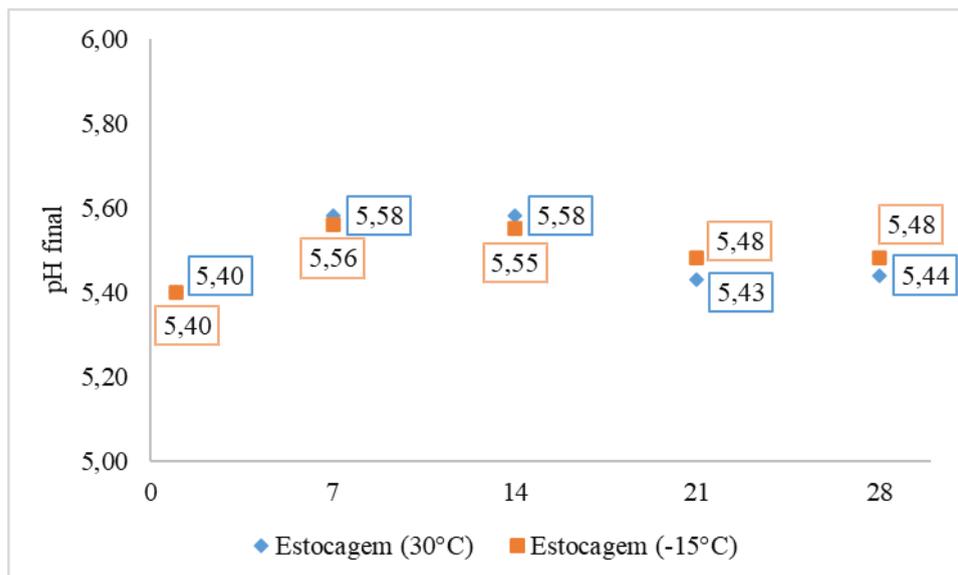


Figura 22: Dados obtidos nas análises da umidade final e pH dos sólidos fermentados liofilizados e estocados (30°C e -15°C) obtidos por FES em biomassa residual de açai.

Conforme demonstrado na **figura 22**, não houve variação significativa no pH obtido dos sólidos fermentados liofilizados em armazenamento (-15° C e 30°C) contribuindo para a hipótese de que a não variação do pH contribui para a estabilidade das enzimas presentes nos sólidos fermentados. De acordo com Mensink e colaboradores (2017), a queda do pH é claramente problemático para formulações de proteínas podendo influenciar o seu desempenho.

Merece menção extra que as condições da liofilização, por exemplo, a taxa de congelamento na liofilização, apresenta extrema importância para maximizar a estabilização da proteína e, portanto, essas condições devem ser escolhidas com cuidado, como já citado este estudo utilizou o freezer para o método de congelamento, porém o uso do nitrogênio líquido poderia favorecer o processo e potencializar a estabilidade da enzima (MENSINK et al., 2017).

Os preparados enzimáticos sólidos permaneceram estocados nas seis condições descritas durante dois meses, os resultados obtidos (**figura 23**) demonstra graficamente a atividade residual obtida comparado a atividade enzimática obtida do sólido fermentado in natura obtida no primeiro dia do experimento.

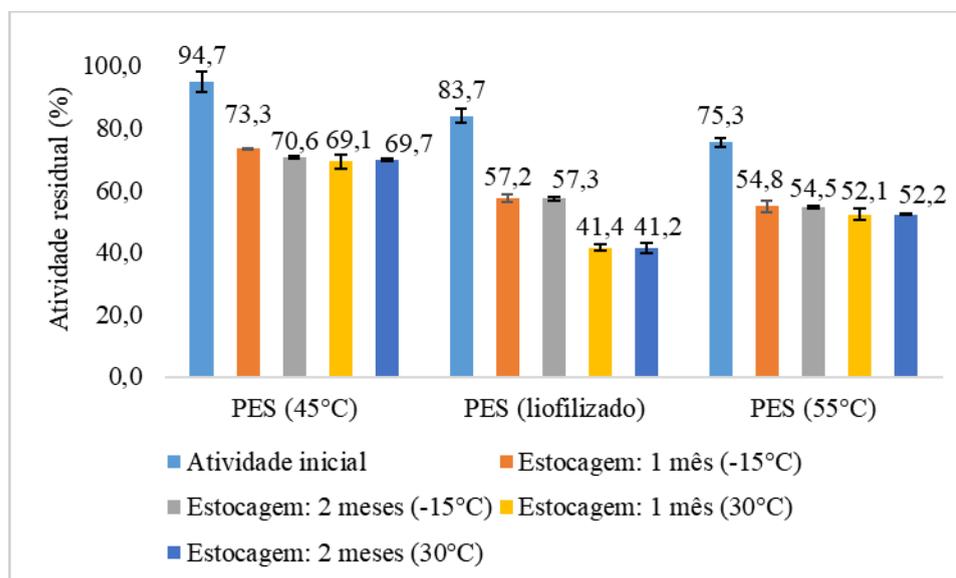


Figura 23: Atividade residual obtida da enzima β -mananase após o processo de secagem (45°C e 55°C) e liofilização do preparado enzimático sólido (PES) estocados a 30°C e -15°C durante 1 e 2 meses em relação a atividade enzimática obtida do sólido fermentado in natura obtidos por FES em biomassa residual de açúcar.

A análise comparativa demonstra que os sólidos fermentados secos em 45°C e armazenados, tanto em temperatura ambiente quanto a -15°C, apresentaram mais de 69% de atividade residual mesmo após dois meses de estocagem. Os resultados comprovam que após 60 dias, a enzima obtida ainda está acima de 50% de sua capacidade de atuação.

No caso do preparado enzimático sólido submetido ao processo de liofilização, estocados a -15°C, a atividade residual obtida após dois meses permanece acima de 57%. Já o armazenado em temperatura ambiente, após 30 e 60 dias apresentou mais de 40% de atividade residual, quando comparada a atividade obtida dos sólidos fermentados in natura.

Os sólidos fermentados secos em 55°C e armazenados, tanto em temperatura a 30°C quanto a -15°C, apresentaram mais de 50% de atividade residual mesmo após 60 dias de estocagem. Cabe destacar que em ambos os casos, os rendimentos apresentam valores muito próximos com variação menor do que 3% confirmando sua estabilidade mesmo após dois meses em estocagem em temperatura ambiente e em congelamento.

Destarte, os sólidos fermentados que passaram pelo processo de liofilização apresentaram variação de 16% em sua atividade enzimática após 60 dias entre os armazenados em congelamento e os armazenados em temperatura ambiente, sendo uma variação maior do que os demais casos estudados. porém, os sólidos fermentados e secos a 45°C apresentou apenas 3,6% de variação em sua atividade enzimática entre as amostras estocadas em -15°C e 30°C, já

a variação do preparado enzimático sólido seco a 55°C apresentou a variação de apenas 2,7% sendo um indicativo de que a longo prazo, os sólidos fermentados não apresentam grande variação quando armazenados em temperatura ambiente ou em congelamento, sendo assim a escolha mais econômica pode ser aplicada com o objetivo de reduzir custos no processo. Merece menção extra que as atividades enzimáticas obtidas nos ensaios foram avaliadas a 60°C, sendo um indicativo de que o preparado enzimático sólido ainda possui capacidade de atuação em temperatura de faixa similares.

Conforme destacado, os açúcares são geralmente eficazes na proteção contra desidratação, congelamento e estresse térmico, entretanto não possuem capacidade de superar todas as instabilidades das proteínas. Por conseguinte, outros fatores como secagem e outros aspectos da formulação (por exemplo: pH, pureza dos excipientes e outros excipientes como surfactantes) também devem ser incluídos na estratégia de estabilização (MENSINK et al., 2017).

O preparado enzimático sólido obtido neste estudo apresenta potencial uso como aditivo alimentar na formulação de rações isso porque os sólidos fermentados obtidos neste trabalho são uma fonte potencial de mananases, com capacidade de serem utilizadas em rações para aves trazendo benefícios relacionados à digestibilidade da ração. As mananases atuam na catalise da hidrólise dos β -mananos encontrados em ingredientes de rações de aves e suínos que naturalmente provocam uma resposta imunológica desnecessária, deste modo a enzima atua melhorando a eficiência alimentar do animal por melhorar a digestão e absorção dos nutrientes trazendo impacto positivo na integridade intestinal, além de reduzir custos de alimentação e permitir maiores ganhos financeiros. O estudo apresentado por Silva (2022), apresenta a quantificação de proteínas da biomassa residual do açaí antes e após 168 horas de fermentação em estado sólido utilizando o fungo *A.niger*. O teor de proteínas totais aumentou de 4,8g para 8,81g a cada 100 gramas de sólidos, representando o aumento de 83,5% mesmo após o processo de secagem em estufa. Conforme relatado pelo autor, o resultado indica que o metabolismo microbiano, com a produção de enzimas e outras proteínas pertencentes ao grupo de metabólitos secundários, assim como o crescimento da biomassa microbiana, resultou no enriquecimento proteico da matriz sólida. Em vista disso, o preparado enzimático sólido obtido neste estudo apresenta potencial uso como aditivo na formulação de rações.

6. CONCLUSÃO.

A biomassa residual do açaí apresentou bom desempenho quando empregado como matriz sólida no processo de fermentação em estado sólido, possibilitando a produção do extrato bruto enzimático contendo enzimas β -mananases, produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*.

A enzima β -mananase obtida neste estudo apresentou atuação em toda a faixa de pH estudado (4,6 – 7,4), além disso a variação de pH não apresenta efeito estatisticamente significativo, não exercendo influência considerável, já a variação de temperatura apresentou efeito positivo na atividade da β -mananase (36-64°C) e quando avaliada a partir de 64°C até 100°C se manteve ativa em toda faixa tendo um ótimo de atividade na faixa de 64 a 85°C.

O estudo de termoestabilidade enzimática sem o uso de estabilizantes ou adjuvantes, obtida neste trabalho, possui resultado promissor, já que ao ser incubado na temperatura a 60°C, o extrato enzimático obtido apresentou mais de 80% de sua capacidade de desempenho após 168 horas e mais de 65% após mais de 10 dias. Além disso, a enzima obtida possui propriedade de ser empregue em até 72 horas consecutivas em temperatura de 65°C mantendo atividade relativa superior a 50%. Já em 70°C, a enzima possui potencial de aplicação em reações de até 4 horas. Em vista disso, o extrato bruto enzimático apresenta potencial para aplicação em processos de hidrólise para produção de monossacarídeos e dissacarídeos que geralmente são conduzidos em temperaturas mais altas, com os principais objetivos de aumentar a velocidade de reação e evitar contaminação microbiológica.

O preparado enzimático sólido após passar pelo processo de secagem a 45°C apresentou melhor atividade residual quando comparada ao rendimento obtido após o processo de secagem a 55°C e liofilização. A atuação da enzima obtida apresenta respostas atraentes do ponto de vista industrial visto que possui capacidade de estocagem prolongada sendo uma característica positiva para aplicação, custos e logística. Este resultado também representa uma particularidade positiva já que utiliza método mais simples e econômico do que o processo de liofilização. Além disso, os rendimentos próximos obtidos após o armazenamento em temperatura ambiente e em congelamento após dois meses torna facultativo o método escolhido para estocagem, sendo o armazenamento em temperatura ambiente mais econômico e viável quando se trata de volumes maiores de produção.

Apesar da estabilidade dos sólidos fermentados ser pouco relatado na literatura, o preparado enzimático sólido obtido neste estudo apresenta potencial de utilização como aditivo alimentar na formulação de rações e possibilidade de estocagem sem uso de estabilizantes

mantendo sua capacidade de atuação sendo uma alternativa promissora como forma de estocagem da enzima.

7. PERSPECTIVAS.

Os resultados obtidos neste trabalho abrem caminhos para estudos adicionais, entre os quais se destacam:

- Avaliar a estabilidade do extrato enzimático bruto em armazenamento a -15°C .
- Avaliar o efeito do pH e temperatura sobre a atividade β -mananásica, assim como a estabilidade, neste caso em condições de pH alcalino já que representa uma faixa de maior interesse em processos industriais.
- Avaliar a capacidade da enzima obtida em catalisar hidrólise utilizando substrato comumente utilizados em produções industriais como por exemplo a goma guar.
- Purificação enzimática com objetivo de melhor avaliar suas características físico-químicas.
- Estudo do escalonamento da produção enzimática.

REFERÊNCIAS.

ABDESHAHIAN, Peyman *et al.* Utilization of palm kernel cake for production of β -mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid substrate fermentation using an aerated column bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 103, 2010.

ALTMAN, R. F. A. Estudo químico de plantas amazônicas. Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte. **Anais**. Belém: 1956.

BARALDI, I. J.; GIORDANO, R. L. C.; ZANGIROLAMI, T. C. Enzymatic hydrolysis as an environmentally friendly process compared to thermal hydrolysis for instant coffee production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 763-771, 2016.

BUFALINO, L.; GUIMARÃES, A. A.; SILVA, B. M. S.; SOUZA, R. L. F.; MELO, I. C. N. A.; OLIVEIRA, D. N. P. S.; TRUGILHO, P. F. Local Variability for Yield and Physical Properties of Açaí Waste and Improvement of its Energetic Attributes by Separation of Lignocellulosic Fibers and Seeds. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, Melville, v. 10, 2018.

CAVALCANTE, Carlos Eduardo Cordeiro *et al.* Economia açaífera na Amazônia - Alto crescimento, baixo desenvolvimento e declínio alimentar dos povos regionais. **Crescimento e desenvolvimento numa perspectiva interdisciplinar: ensaios sobre o crescimento econômico brasileiro**, v. 1, n. 1, p. 157-181, 2022.

CHAUHAN, Prakram Singh *et al.* Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, p. 1817-1830, 2012.

COHEN, LAURO ARTHUR FARIAS PAIVA; AYRES, ELIANE. Relações entre design, materiais e a cadeia produtiva do açaí (*euterpe oleracea* mart.). In: **VIII Simpósio de Design Sustentável/Symposium on Sustainable Design**. 2021.

DAWOOD, A.; MA, K. Applications of Microbial β -Mannanases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. December, p. 1–17, 2020.

DE JESUS, S. S.; MACIEL FILHO, R. Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying-a comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 625-631, 2014.

DOS SANTOS, JH Paiva, AN Meza, J. Cota, TM Alvarez, R. Ruller, RA Prade, FM Squina, MT Murakami. Informações moleculares sobre a especificidade do substrato e a estabilidade térmica de uma endo-1,4- β -D-mannanase bacteriana GH5-CBM27 J. **Estrutura. Biol.**, 177, p. 469 – 476, 2012

EICHLER, Paulo. Cultivo em estado sólido de *aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte para a produção de lipases. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

EMBRAPA Amazônia. Sistema de Produção do Açaí. 2ª Edição. Belém: EMBRAPA, 2006.

FARINAS, C. S. et al. Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. **Embrapa Instrumentação-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2009.

FAVARO, Camila P. et al. β -Mannanase production using coffee industry waste for application in soluble coffee processing. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 227, 2020.

INFANTE, Juliana da Conceição. Imobilização e caracterização bioquímica de mananases e pectinases produzidas por *Aspergillus brasiliensis*: potencial para aplicação na clarificação de sucos de frutas. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, p. 4497-4559, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção agropecuária. Açaí. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/acai-cultivo/br>. Acesso em: 10 jul. 2023.

ISMAIL, Shaymaa A.; HASSAN, Amira A.; EMRAN, Mohamed A. Economic production of thermo-active endo β -mannanase for the removal of food stain and production of antioxidant manno-oligosaccharides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101-387, 2019.

JANA, U. K. et al. Production optimization and characterization of mannooligosaccharide generating β -mannanase from *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 308–314, 2018.

KOTE, NV, Patil, AGG & Mulimani, VH Otimização da produção de endo- β -1,4 mananases termoestáveis de *Aspergillus niger gr* e *Aspergillus flavus gr* recentemente isolados. **Appl Biochem Biotechnol** v.152, p.213–223, 2009.

LIMA, A. C. P. et al. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açaí (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 3, p. 925–935, 2019.

LIMA, Ana Laura. Área plantada com açaizeiros de terra firme gerados pela pesquisa cresce 675% no Brasil. **EMBRAPA, AMAZÔNIA**, 21 março. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/79157772/area-plantada-com-acazeiros-de-terra-firme-gerados-pela-pesquisa-cresce-675-no-brasil#:~:text=S%C3%B3%20no%20estado%20do%20Par%C3%A1,e%2C%20atualmente%2C%20tem%2015%20hectares>. Acesso em: 10 jul. 2023.

LIMA, Ana Laura. Novo edital da Embrapa seleciona produtores para comercializar mudas e sementes de açaí. **EMBRAPA, AMAZÔNIA**, 23 junho. 2023. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/81414855/novo-edital-da-embrapa-seleciona-produtores-para-comercializar-mudas-e-sementes-de-acai>. Acesso em: 10 jul. 2023.

LIMA, Anna C. et al. β -Mannanase production by *Penicillium citrinum* through solid-state fermentation using açai residual biomass (*Euterpe oleracea*). **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 10, p. 2744-2754, 2021.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos. Vol. 3, 1ª ed, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 594p., 2001.

MARANHO, Álisson Sobrinho; DE PAIVA, Ary Vieira. Produção de mudas de *Physocalymma scaberrimum* em substratos compostos por diferentes porcentagens de resíduo orgânico de açai. **Floresta**, v. 42, n. 2, p. 399-408, 2012.

MATTIETTO, R. de A., and MATTA, V.M. "Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica de polpas de açai pasteurizadas." In: **Congresso brasileiro de engenharia química**, 19., 2012, Búzios. Anais. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2012. p. 3208-3213., 2012.

MAYRINCK, JR., RICARDO JESUS RABELLO. Produção de fitase e tanase em subprodutos do café por fermentação no estado sólido. Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

MENSINK, Maarten A. et al. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288-295, 2017.

MONTEIRO, A. F. et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

MONTEIRO, Valdirene Neves; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, p. 165-178, 2008.

NETO MAM, LOBATO AKDS, ALVES JD et al (2010). Seed and seed-ling anatomy in *Euterpe oleracea* Mart. during the germination process. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Vol.8, n 2, p. 1147-1152, 2010.

NORITA, Siti et al. Avaliação das atividades de enzimas degradadoras de mananas brutas concentradas produzidas por *Aspergillus niger*. **Jornal da Malásia de Microbiologia**, p. 171-180, 2010.

OLIVEIRA, Johnatt AR et al. Evaluation of alkaline delignification (NaOH) of açai seeds (*Eutherpe oleracea*) treated with H₂SO₄ dilute and effect on enzymatic hydrolysis. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 43, 2015.

PAPADAKI, Eugenia et al. Viabilidade da produção de enzimas multi-hidrolíticas a partir de resíduos otimizados de bagaço de uva e mistura de farelo de trigo usando *Aspergillus niger* em um processo de produção integrado ácido cítrico-enzimas. **Tecnologia de biorrecursos**, v. 309, p. 123317, 2020.

PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2005.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v. 144, p. 696-703, 2015.

RÄTTÖ, M.; POUTANEN, K. Production of mannan-degrading enzymes. **Biotechnology Letters**, 1988. v. 10, n. 9, p. 661–664.

RODRIGUES, Cristiane et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. **Biotecnologia aplicada à agroindústria**, 2017.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, Ursula Fabiola et al. *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

SANTANA, Irene. Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana. **EMBRAPA**, 27 maio 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana>. Acesso em: 11 jul. 2023.

SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, Kleberson. Do concreto à biomassa - O reaproveitamento do caroço do açai. **DOL, PARÁ**, 22 dez. 2020. Disponível em: <https://dol.com.br/noticias/para/noticia-555119-do-concreto-a-biomassa---o-reaproveitamento-do-caroco-do-acai.html?d=1>. Acesso em: 03 jun. 2023.

SANTOS, Priscila Souza dos, et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. 2018.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol** **59**, p. 426–435, 2002.

SILVA, D. M. DA. Caracterização do extrato enzimático bruto de β-mananases obtido por Fermentação em Estado Sólido com a biomassa residual do açai. Monografia de graduação em Ciências Biológicas (Biotecnologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

SILVA, D. M. DA. Produção de β -mananases e valorização de coprodutos derivados do processamento do açaí (*Euterpe oleracea*) visando a nutrição de aves. Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2022.

SONI, Hemant et al. Purification and characterization of β -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-11, 2016.

SRIVASTAVA, Praveen Kumar; KAPOOR, Mukesh. Extracellular endo-mannanase from *Bacillus sp.* CFR1601: Economical production using response surface methodology and downstream processing using aqueous two phase system. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 672-681, 2013.

SRIVASTAVA, Praveen Kumar; KAPOOR, Mukesh. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 1, p. 1-19, 2017.

SURYAWANSHI, Rahul Kumar et al. Immobilization of *Aspergillus quadrilineatus* RSNK-1 multi-enzymatic system for fruit juice treatment and mannoooligosaccharide generation. **Food chemistry**, v. 289, p. 95-102, 2019.

TAVARES, G. dos S.; HOMMA, Alfredo Kingo Oyama. Comercialização do açaí no estado do Pará: alguns comentários. 2015.

TAVARES, I. M. DE C.; JÚNIOR, B. B. DO N.; FRANCO, M. Utilização de extrato enzimático bruto produzido a partir de resíduo agroindustrial na otimização da extração de óleo essencial. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 2063-2070, 2015.

TSANG, Adrian et al. Abordagens analíticas e computacionais para definir o secretoma de *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. S153-S160, 2009.

VAN ZYL, W. H.; ROSEA, S. H.; TROLLOPEB, K.; GÖRGENSB, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1203- 1213, 2010.

VIKARI, L. et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.121–145, 2007.

YAMAGUCHI, Shana Kimi Farias et al. Liofilização de produtos lácteos: uma revisão. **Revista Espacios**, v. 38, n. 22, p. 2-12, 2017.

YIN, Jun-Shuai et al. Optimization of production conditions for β -mannanase using apple pomace as raw material in solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 101-108, 2013.

ZHANG, Hui; SANG, Qing. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical engineering journal**, v. 97, p. 101-110, 2015.