

SECAGEM POR SPRAY-DRYING DE FITASES E XILANASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

I.B. DELMASCHIO^{1*}, R. LAURITO¹, E. GOMES², R. GREINER³, J.C. THOMÉO¹

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia de Alimentos

²Universidade Estadual Paulista, Departamento de Microbiologia

³Institut Max Rubner, Karlsruhe, Alemanha

*e-mail: isabelabellei@hotmail.com

RESUMO

Enzimas microbianas como fitase e xilanase são interessantes para a indústria alimentícia dos animais monogástricos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das condições de secagem por *spray dryer* nas enzimas extracelulares, fitases e xilanases, produzidas por fungos em cultivo em estado sólido. O meio de cultivo utilizado pelo fungo *Lichtheimia ramosa* para produção de fitases foi composto por bagaço de cana de açúcar (BC), farelo de trigo (FT) e bagaço de laranja (BL). Para produção de xilanase foi empregado o fungo *Myceliophthora thermophila* e o meio de cultivo utilizado composto de BC e FT. As enzimas foram submetidas ao *spray dryer* com o farelo de soja como adjuvante. Para os ensaios de secagem foi empregada a técnica de superfície de resposta, sendo usadas variáveis preditoras a temperatura de saída do ar, a vazão de alimentação de suspensão e a concentração de sólidos. Os resultados indicaram a vazão e concentração de sólidos como variáveis significativas. A suspensão na condição ótima de secagem continha 7,5% e a vazão foi de 3 mL/min, sendo a temperatura escolhida de 83 °C. O ensaio realizado nestas condições proporcionou retenção 83% de atividade de fitase e de 85% xilanase.

1 INTRODUÇÃO

A produção industrial de aves e suínos assumiu caráter de importância para a economia de nosso país nos últimos anos. Grande parte deste crescimento está associado ao conhecimento do valor nutricional dos ingredientes das rações e das exigências nutricionais dos animais nas diferentes fases produtivas. Na criação de animais monogástricos a alimentação representa cerca de 70% do custo de produção (ARAÚJO, 2005; FERREIRA, BISPO e MONTEIRO, 2013).

Os alimentos comumente utilizados na nutrição dos animais monogástricos são legumes, sementes e grãos, dentre os quais

destacam-se o milho e farelo de soja, sendo o fitato (hexafosfato de mio-inositol) a principal forma de armazenamento de fósforo nesses alimentos. No entanto, o fitato pode complexar-se com nutrientes da dieta durante a digestão, diminuindo a biodisponibilidade desses e podendo comprometer o desempenho zootécnico dos animais, uma vez que estes animais não possuem fitases endógenas para a digestão do fitato, resultando em dificuldade de ganho de peso e problemas de fósforo nas fezes (RAVINDRAN et al. 1995).

Outro fator antinutricional presente nos alimentos vegetais são os polissacarídeos não amiláceos (PNA). Os PNA são componentes da parede celular vegetal e são geralmente a celulose, hemicelulose, quitina e pectinas, os

quais podem interferir no desempenho zootécnico. Por não poderem ser degradados por enzimas endógenas, estes elementos ocasionam problemas como a modificação no tempo de permanência e viscosidade do alimento no trato digestivo dos animais monogástricos (CAMPESTRINI, SILVA, e APPELT, 2005). Assim, a administração de fitases e xilanases exógenas surge como uma alternativa para que animais monogástricos possam hidrolizar fósforo fítico e PNA presente nesses alimentos (RAVINDRAN, BRYDEN e KORNEGAY, 1995; NAVES, 2012). No entanto, o mercado de enzimas para alimentação animal é concentrado nas mãos de poucos fabricantes, o que torna o produto caro. Neste contexto, o cultivo em estado sólido reveste-se em alternativa atraente por empregar substratos de baixo custo e produzir enzimas em concentrações elevadas.

O principal desafio na produção de proteínas e enzimas comerciais é o de manter sua estabilidade em solução aquosa, pois esta mede uma variedade de inconvenientes como a possibilidade de contaminação por micro-organismos e degradações químicas e físicas durante as etapas de transporte, armazenamento e aplicação (NAMALDI, ÇALIK e ULUDAG, 2006; COSTA-SILVA, 2010). Sendo assim, formulações enzimáticas desidratadas apresentam vantagens em relação aos extratos enzimáticos aquosos, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio (LIAO et al. 2003).

A secagem por atomização, mais conhecida por *spray drying*, é uma alternativa viável de desidratação de produtos termosensíveis, sendo uma operação amplamente utilizada em diversas aplicações, tais como na indústria de alimentos, para produção de proteína de leite, ovos, sucos, café instantâneo, sopas e aromas em pó, por exemplo, e na indústria farmacêutica, na produção de antibióticos, enzimas, vitaminas e suspensões sólidas, dentre várias outras

aplicações (ESTEVES, 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN, RIELLY e STAPLEY, 2007).

Como alternativa de minimizar os efeitos indesejáveis da secagem por *spray-drying*, faz-se necessário o controle de parâmetros operacionais como temperatura do ar, concentração de sólidos e vazão do líquido.

Visando a proteção da enzima também se faz o uso de aditivos, que podem ser estabilizadores ou protetores. Encontra-se na literatura a aplicação de diversos aditivos como maltodextrina, açúcares (celobiose, glicose, lactose, sucrose e trealose), polímeros (carboximetilcelulose, celulose micro-cristalina, dextrana e goma arábica) e polióis (glicerol, manitol, propileno glicol, sorbitol e xilitol) (BELGHITH, CHAABOUNI e GARGOURI, 2001; DePAZ et al. 2002; SELIVANOV, 2005; NAMALDI, ÇALIK e ULUDAG, 2006; DOMINGUES et al. 2008; SLOTH et al. 2009; COSTA-SILVA, 2010). Sato et al. (2013) utilizaram adjuvantes não convencionais, tais como farelo de milho e farelo de soja, para a secagem de fitases.

Sendo assim, o presente trabalho descreve a secagem por *spray-drying* das enzimas extracelulares produzidas por fungos termófilos em cultivo em estado sólido empregando-se rejeitos sólidos agroindustriais. Xilanases foram produzidas pelo fungo *Myceliophthora thermophila*, enquanto que fitases foram sintetizadas pelo fungo *Lichtheimia ramosa*. Na secagem foi utilizado o adjuvante farelo de soja, visando futura aplicação como ração animal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção de Fitase e Xilanase

Os cultivos foram conduzidos em embalagens de polipropileno, adaptadas com bocal que permitiam trocas gasosas através de

um tampão de algodão, contendo massa inicial de 25 gramas (massa seca).

O meio de cultivo empregado para produção de fitases foi composto por bagaço de cana de açúcar (BC), farelo de trigo (FT) e bagaço de laranja (BL). O bagaço de cana foi gentilmente cedido pela Usina Vale, de Onda Verde – SP, e foi lavado e seco em estufa de convecção forçada a 60 °C até a obtenção de peso constante; o farelo de trigo foi adquirido no comércio local e não passou por qualquer operação antes de ser utilizado; o bagaço de laranja foi gentilmente cedido pela Citrosuco, de Catanduva – SP, foi moído em moinho de facas e seco em estufa a 60 °C até peso constante. A solução nutriente foi a mesma usada por Spier et al. (2010), composta de tampão citrato de sódio pH 5,0 contendo 0,5% de citrato de amônio, KCl 2 Mm, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 Mm, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 Mm e Tween 0,1%. A concentração dos esporos foi fixada em 10^7 esporos/mL e a umidade final do substrato em 70% (b.u.). Os meios de cultivo ocorreram na proporção 1:2:2 para BC, FT e BL, respectivamente, em câmara DBO por 96 horas a 45 °C. A extração das enzimas do meio foi realizada em agitador orbital por 30 minutos, a 45 °C com 250 mL de tampão acetato de sódio com pH 5,0.

Para a determinação da atividade das fitases foi empregado o método de Heinonen e Lahti (1981), para o qual uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 μmol de fosfato inorgânico por minuto de reação nas condições do ensaio.

Já para a produção de xilanases, o meio de cultivo empregado foi composto de BC e FT, processados como descrito anteriormente. A solução nutriente foi a mesma usada por Casciadori (2014) composta por: sulfato de amônio (1%, v/v); MAP (monofosfato de amônio) (3 g/L); cloreto de potássio (2 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L); CaCl_2 (0,1 g/L) e Tween 80 (0,1%, v/v), ajustada a pH 5,0, sendo os três primeiros itens fertilizantes

agrícolas adquiridos no comércio local. A concentração dos esporos foi fixada em 10^7 esporos/mL e umidade final do substrato em 75%. Os meios de cultivo ocorreram na proporção 7:3 para BC e FT, respectivamente, em câmara DBO por 96 horas a 45 °C. A extração das enzimas do meio foi realizada em agitador orbital por 30 minutos, a 45 °C com 250 mL de tampão acetato de sódio com pH 5,0, por grama de sólido seco.

A atividade das xilanases foi determinada segundo Ghose e Bisaria (1987), sendo que uma unidade de atividade enzimática foi definida, como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de açúcar redutor do substrato (xilana) por minuto.

As suspensões provenientes dos cultivos foram filtradas em tecido *voil*, congeladas em freezer doméstico a -12 °C e utilizada como extrato enzimático bruto (EEB). Para os ensaios de secagem, os EEB foram previamente descongelados e em seguida misturados em igual volume num mesmo béquer e adicionados ao adjuvante farelo de soja.

A avaliação da atividade enzimática após a secagem em *spray dryer* foi realizada reconstituindo-se o pó, com base no teor de sólidos totais da formulação líquida. Essas avaliações enzimáticas foram feitas sempre no dia seguinte à secagem, tanto para as formulações líquidas como para os pós.

2.2 Ensaios de Secagem

As amostras foram analisadas em uma balança com lâmpada halogênia Ohaus MB-45 (Metler - Toledo).

Os ensaios foram realizados no *spray dryer* MSD 0,5 (Labmaq do Brasil), dotado de bico atomizador de duplo fluído com orifício de saída de 3,0 mm, sendo a coleta dos pós em um ciclone de alumínio. O bombeamento da suspensão líquida foi realizado através de uma bomba dosadora QDOS – 30 (Watson

Marlow). A temperatura de saída do ar e a vazão de alimentação do líquido foram controladas. Em todos os ensaios a pressão do ar de atomização, vazão do ar de secagem e vazão do ar de atomização foram fixados em 6,5 Kg/cm², 0,55 m³/min e 50 L/min, respectivamente.

A operação foi iniciada com o aquecimento do gás de secagem até que a temperatura de saída atingisse o valor desejado, sendo então bombeada água destilada no bico atomizador, na vazão pré-determinada para o experimento, até o equipamento entrar em estado estacionário, quando, então, a água foi substituída pela amostra. A suspensão de EEB e adjuvante foi mantida em constante agitação, à temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético.

Os ensaios para a otimização da condição ideal de secagem foram realizados com o farelo de soja como adjuvante, mantendo-se fixa a concentração de sólidos do extrato enzimático bruto em 1,5%. Tais ensaios foram conduzidos seguindo-se um planejamento estatístico fatorial rotacional de composto central, com seis repetições no ponto central, sendo três fatores analisados: temperatura de saída do ar de secagem ($T_{saída}$), vazão de alimentação da solução no *spray dryer* (Q_{alim}) e concentração de sólidos totais na formulação (ST), sendo os níveis de cada variável apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para os ensaios de otimização das condições de secagem.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
$T_{saída}$ (°C)	83	90	100	110	117
Q_{alim} (mL/min)	3	5	8	11	13
ST (%)	5	7	10	13	15

O efeito da secagem por *spray dryer* sobre as enzimas foi analisado através das atividades enzimáticas obtida após a secagem.

A fim de encontrar a melhor forma para a extração das enzimas após as secagens, foi adicionado tampão acetato de sódio a 0,05 M e pH 5,0 às amostras pulverulentas e o teor de sólidos das formulações foram reconstituídos. Então essas foram mantidas sob agitação constante com auxílio de agitador magnético na temperatura de 4 °C, por 3, 4, 5 e 6 horas.

Após o tempo de extração, a suspensão foi centrifugada a 10000 x g, na temperatura de 5 °C por 30 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a secagem das suspensões, suspeitou-se que a enzima pudesse estar adsorvida à superfície do adjuvante, de forma que esta não pudesse ser quantificada caso não fosse extraída do pó seco. A fim de encontrar a melhor forma para a extração das enzimas dos pós após as secagens, foram feitos testes variando-se os tempos de extração, apresentados na Tabela 2. As atividades relativas (AR) e atividades enzimáticas (AE) foram calculadas em relação à mistura líquida do adjuvante com EEB (Mist) e ao EEB.

Tabela 2. Avaliação do melhor tempo de extração dos pós obtidos utilizando adjuvante farelo de soja, em secagem por *spray dryer*.

	AR (%)		AE (U/gss)	
	Fitase	Xilanase	Fitase	Xilanase
EEB	100	100	0,18	849,9
Mis/EEB	209,4	76,2	0,38	647,6
3 horas	40,2	52,1	0,15	443,1
4 horas	74,3	73,3	0,11	623,0
5 horas	31,2	71,1	0,09	604,6
6 horas	22,6	51,4	0,03	436,6

De acordo com a Tabela 2 nota-se que os melhores resultados para a xilanase foram obtidos com o tempo de 4 horas de extração, e para as fitases o mesmo foi observado. Passado esse tempo ótimo, as atividades das enzimas apresentaram queda. Diante dessas

informações, suspeita-se que as enzimas tenham sido adsorvidas à superfície do farelo usado como adjuvante durante o processo de secagem. Essa interação não possibilitou a total quantificação enzimática dos pós, pela dificuldade na extração das enzimas. A queda na atividade das fitases e xilanases a partir de 5 horas de extração pode ter se dado pela desnaturação das enzimas extraídas ou pela possibilidade de novas interações dessas com as superfícies de contato.

Processos como os de armazenamento ou manipulação podem alterar a estrutura proteica de tal modo que esta seja afetada irreversivelmente e com isso perca a sua função. A adsorção das proteínas numa superfície e suas interações geram preocupações em seguimentos como os da biotecnologia e processamento de alimentos, pois tais interações podem interferir de modo crucial na execução do processo. Nakanishi Sakiyama, e Imamura, (2001) citam que enzimas imobilizadas por adsorção apresentam alterações em sua atividade não só pela quantidade de enzima adsorvida, mas também pela queda da estabilidade e atividade daquelas que são possíveis de serem extraídas e analisadas. O efeito adsorção depende de fatores como as propriedades das proteínas, o tipo de superfície e das condições ambientais, tais como, temperatura, pH, força iônica e composição do tampão. Em relação às propriedades das proteínas, a carga, tamanho da molécula, estabilidade estrutural, composição de aminoácidos, e conformação estérica são variáveis que interferem na quantidade adsorvida (BOS et al. 1994; NAKANISHI, SAKIYAMA e IMAMURA, 2001; RABE, VERDES e SEEGER, 2011). No entanto, tais informações fogem do enfoque desse trabalho.

Definido o tempo de extração enzimática dos pós secos, foi realizado ensaios de secagem, cujo resultados são apresentados na Tabela 3, onde as atividades enzimáticas são fornecidas em Unidades por

grama de substrato seco (U/gss), uma unidade usual para enzimas obtidas por cultivo em estado sólido.

Tabela 3. Resultados para as atividades das fitases e xilanases encontradas nos pós de farelo de soja após os ensaios de otimização das condições de secagem.

Ensaio	T _{saída} (°C)	Q _{alim} (mL/min)	ST	Atividade enzimática (U/gss)	
				Fitase	Xilanase
1	90	5	7	0,29	346,9
2	110	5	7	0,35	240,8
3	90	11	7	0,46	385,7
4	110	11	7	0,38	271,4
5	90	5	13	0,26	261,2
6	110	5	13	0,28	244,9
7	90	11	13	0,44	277,5
8	110	11	13	0,19	251,0
9	83	8	10	0,25	361,2
10	117	8	10	0,38	381,6
11	100	3	10	0,49	514,3
12	100	13	10	0,23	375,5
13	100	8	5	0,31	386,9
14	100	8	15	0,53	83,3
15	100	8	10	0,34	291,8
16	100	8	10	0,21	361,2
17	100	8	10	0,29	363,3
18	100	8	10	0,32	312,2
19	100	8	10	0,37	334,7
20	100	8	10	0,43	316,3
Média global				0,34	318,1
Desvio Padrão				0,09	86,1
Intervalo de Confiança (95%)				0,04	40,28
Coeficiente de Variação (%)				27,9	27,1

De acordo com a Tabela 3, nota-se que embora as duas enzimas tenham sido cultivadas por fungos e substratos diferentes, o coeficiente de variação para a média de todos os tratamentos (27%) é praticamente o mesmo para a fitase e xilanase. Uma comparação direta entre as médias dos resultados não é possível devido à diferença das ordens de grandeza das atividades das fitases e xilanases. Para poder comparar estas médias, o valor de cada atividade foi dividido

pela atividade máxima observada dentre todos os ensaios, um procedimento típico de normalização. Comparando-se as atividades normalizadas, através de um teste de Turkey a 95% de índice de significância, constata-se que ambas são iguais. Como as atividades enzimáticas foram obtidas a partir de suspensões de farelo de soja reconstituídas a partir dos pós secos, a combinação de adsorção das enzimas à matriz sólida com a influência das condições de secagem parecem estar afetando igualmente ambas as enzimas. No entanto, estudos específicos têm de ser realizados para avaliar a influência de cada uma dessas variáveis sobre as atividades.

A interação entre uma proteína e um suporte sólido não é simples de ser compreendida. Kondo e Urabe (1995), citados por Nakanishi, Çalik e Uludag, (2001), analisaram a adsorção de α -amilases em partículas de sílica e constataram que a redução da atividade enzimática estava intimamente relacionada com a alteração da quantidade de α -hélice na conformação da enzima. Baron et al. (1999) estudaram mudanças nas atividades e na estrutura secundária da α -quimiotripsina adsorvida na superfície do mineral montmorilonita e notaram que provavelmente a inativação da enzima deu-se pela interação dos aminoácidos principais da enzima com a superfície do mineral carregada negativamente. Gray (2004) cita que questões básicas sobre os detalhes estruturais de uma proteína em seu estado adsorvido ainda são difíceis de responder. Algumas das dúvidas incluem se a proteína desnatura e/ou se ainda é ativa. Infelizmente, devido às consideráveis dificuldades experimentais, informações detalhadas a nível molecular sobre essas mudanças de conformação são escassas, o que dificulta o desenvolvimento de teorias sobre a adsorção de proteínas.

A maioria dos trabalhos reportados na literatura sobre o estudo da adsorção de proteínas em superfícies sólidas utilizam

materiais inertes, como o quartzo, vidro, metais e grafite, (DHRUV, 2009; RABE, VERDES, e SEEGER 2011) o que dificulta a compreensão do modo como ocorre a adsorção das enzimas estudadas ao farelo de soja, um material orgânico complexo, composto por lipídios, proteínas, carboidratos e minerais.

A faixa de variação das atividades enzimáticas de fitase foi de 0,19 a 0,53 U/gss, enquanto que a variação das atividades das xilanases foi de 83,26 a 514,28 U/gss. Ainda que estas faixas sejam amplas, os intervalos de confiança são relativamente estreitos em torno do valor médio das atividades, indicando baixa variabilidade e que há pouca interferência das variáveis de processo nas faixas adotadas sobre as atividades enzimáticas. Deste modo, definindo-se as condições ótimas de secagem, não necessitaria ser mantido rigorosamente no ponto ótimo de operação, facilitando os procedimentos operacionais.

Como as análises de variância para atividades enzimáticas para fitases não foram conclusivas, sendo a porção estocástica do modelo estatístico mais significativa que a determinística, a otimização do processo de secagem foi definida com base nos resultados apresentados para a xilanase. A partir da análise de variância apresentada na Tabela 4, o ajuste do modelo não pode ser considerado satisfatório (coeficiente $R^2 = 64\%$).

Tabela 4. ANOVA para atividade enzimática de xilanase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante farelo de soja.

ANOVA			$R^2 = 0,64$	
Parâmetro	GL	SQ	F	p
Regressão	9	63299,8	1,98	0,151
Linear	3	5722,7	0,54	0,667
T_{saída}	1	68,3	0,02	0,892
Q_{alim}	1	15,1	0,00	0,949
ST	1	5639,3	1,59	0,236
Quadrática	3	56384,4	5,29	0,019
T_{saída}xT_{saída}	1	9488,2	4,36	0,063
Q_{alim}xQ_{alim}	1	9202,1	3,71	0,083

Tabela 4. Continuação

ANOVA			$R^2 = 0,64$	
Parâmetro	GL	SQ	F	p
STxST	1	37694,1	10,62	0,009
Interação	3	1192,7	0,11	0,951
$T_{saída} \times Q_{alim}$	1	905,0	0,25	0,625
$T_{saída} \times ST$	1	34,8	0,01	0,923
$Q_{alim} \times ST$	1	252,9	0,07	0,795
Erro residual	10	35501,6		
Falta de ajuste	5	5292,0	0,18	0,961
Erro puro	5	30209,7		
Total	19	98801,5		

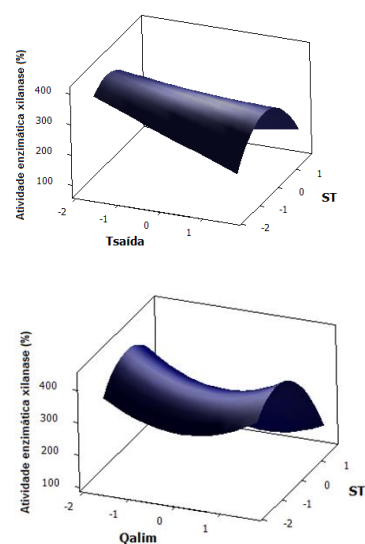
$T_{saída}$ = Temperatura de saída do ar de secagem; ST= teor de sólidos;
 Q_{alim} = vazão de alimentação

Observa-se que ao nível de significância de 95% foi significativo apenas o termo quadrático da temperatura de saída, e se for considerado nível de significância de 90%, também os termos quadráticos vazão de alimentação e teor de sólidos totais.

A partir dos dados apresentados, notam-se melhores condições de conservação nas menores vazões de alimentação e teor de sólidos. Tal observação é comprovada pelas superfícies de resposta mostradas na Figura 1 e pela condição ótima de secagem obtida pela solução das equações canônicas, que indicou máxima atividade para a vazão de alimentação de 3 mL/min, teor de sólidos 7,5% e temperatura de saída de 83 °C.

Os melhores resultados em baixas vazões de alimentação podem estar relacionados ao fato de atomizadores de duplo-fluido apresentarem eficácia reduzida à medida que a vazão de alimentação do líquido aumenta, uma vez que o ar de atomização age sobre o líquido de forma menos homogênea (AMERI e MAA, 2006).

Figura 1. Superfície de resposta para atividade enzimática de xilanase para o pós obtidos em *spray dryer* nos ensaios de otimização das condições de secagem, empregando o adjuvante farelo de soja.



Embora não conclusivas, nota-se a tendência de melhores atividades enzimáticas em temperaturas mais baixas. Observações similares de impactos da degradação de enzimas relacionados a altas temperaturas de secagem são comumente reportados na literatura (NAMALDI, ÇALIK e ULUDAG, 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN, RIELLY e STAPLEY, 2007; YOSHII et al. 2008; BÜRKI et al. 2011). Estudos sugerem que os efeitos negativos do processo ocorrem no período de taxa decrescente de secagem, ou seja, nos últimos estágios da gota dentro da câmara de secagem, quando a umidade da partícula é baixa e a difusão da água para a superfície da gota não consegue manter a saturação, de modo que a temperatura da gota aumenta, aproximando-se da temperatura de saída do ar (AMERI e MAA, 2006; SLOTH et al. 2009; SCHUTYSER, PERDANA e BOOM, 2012).

Em relação ao teor de sólidos ideal, a hipótese normalmente aceita na literatura de que maiores concentrações de adjuvante

resultariam em maior proteção ao bioativo não foi aqui observada. Possivelmente, maiores concentrações de sólidos resultam em maior adsorção de enzimas, que não são recuperadas dos pós para a análise das atividades após a secagem. Concentrações próximas à encontrada no presente trabalho são reportadas na literatura como adequadas. Sato et al. (2013) obteve melhores resultados em ensaio discriminativo de adjuvantes para a secagem de fitases com 10% de farelo de soja. Para Anandharamakrishnan, Rielly e Stapley, (2007) alta concentração de sólidos da suspensão dá origem a uma crosta mais espessa na superfície da partícula que, associado à altas temperaturas do gás de secagem e elevadas taxas de alimentação, resulta na formação rápida de uma massa seca, enquanto o interior ainda está úmido, favorecendo assim a desnaturação das proteínas.

4. CONCLUSÕES

A secagem por *spray-drying* de fitases e xilanases, obtidas por cultivo em estado sólido, foi bem sucedida e houve retenção apreciável das atividades enzimáticas. Um aspecto que foi constatado e deve ser melhor abordado em trabalhos futuros é a questão da adsorção das enzimas sobre o suporte orgânico empregado como adjuvante, farelo de trigo.

Não foi constatada influência significativa das variáveis de secagem temperatura de saída do ar, vazão de alimentação de sólidos e teor total de sólidos sobre as atividades das fitases, enquanto que para a xilanase todas estas variáveis influenciaram significativamente as atividades. A partir do procedimento de otimização, constatou-se que baixas temperaturas e vazões de sólido foram mais favoráveis à manutenção das atividades das xilanases.

NOMENCLATURA

$T_{saída}$ – Temperatura de saída do ar

Q_{Alim} – Vazão de alimentação de suspensão
ST – Teor de sólidos totais na suspensão.

REFERÊNCIAS

AMERI, M.; MAA, Y-F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Drying Technology**, v.24, p. 763–768, 2006.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; RIELLY, C.D.; STAPLEY, A.G.F. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. **Drying Technology**, v.25, p. 799–807, 2007.

ARAUJO, D.M. Avaliação do farelo de trigo e enzimas exógenas na alimentação de frangos e poedeiras. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia**, Universidade Federal da Paraíba, 66p. 2005.

BARON, M.H. et al. Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis. **Journal Colloid Interface Science**, v.214, p.319-332, 1999.

BELGHITH, H., CHAABOUNI, S.E., GARGOURI, A. Stabilization of penicillium occitanis cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p. 253–258, 2001.

BOS, M.A. et al. Influence of the electric potential of the interface on the adsorption of proteins. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 3, p.91-100, 1994.

BÜRKI, K. et al. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 408, p.248–256, 2011.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.A. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 2, n.6, p.254-267, 2005.

CASCIATORI, F. P. Biorreatores de leito fixo para fermentação em estado sólido: ampliação de escala para produção de celulasas de origem fúngica. **Relatório Científico de Bolsa de Doutorado**. São Paulo: FAPESP, 2014.

COSTA-SILVA, T. A. Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lípases produzidas pelo fungo endofílico *Cercospora kikuchii*. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, 2010.

DePAZ, R.A. et al. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme Microbiology Technology**, v.31, p. 765–774, 2002.

DOMINGUES, G.S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**. v.31 n.8 São Paulo, 2008.

DHRUV, H.D. Controlling nonspecific adsorption of proteins at bio-interfaces for biosensor and biomedical applications. **Dissertação de Doutorado em Engenharia Biológica**. Universidade Estadual de Utah. 2009.

ESTEVES, B.N. Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (spray dryer) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade de São Paulo, 2006.

FERREIRA, M.A.M., BISPO, O.N.A., MONTEIRO, D.A.A. Avaliação financeira, de riscos e de custos de transação envolvidos na internalização da produção de ração na suinocultura. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 194-205. Lavras, 2013.

GHOSE, T.K., BISARIA, V.S. Measurement of hemicellulase activities. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v.59, n.12, p.1739-1752, 1987.

GRAY, J.J. The interaction of proteins with solid surfaces. **Current Opinion in Structural Biology**. v.14, p.110–5, 2004.

HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal Biochemistry**. v. 113, p.313–317, 1981.

KONDO, A.; URABE, T.: Temperature dependence of activity and conformational changes in α -amylases with different thermostability upon adsorption on ultrafine silica particles. **Journal Colloid Interface Science**, v.174, p.191-198, 1995.

LIAO, Y.H. et al. Investigation of the physical properties of spray-dried stabilized lysozyme particles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.55, p.1213-1223, 2003.

NAKANISHI, K., SAKIYAMA, T., IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 3, p.233-244, 2001.

NAMALDI, A., ÇALIK, P., ULUDAG, Y. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline

protease powders. **Drying Technology**, v.4, p.1495–1500, 2006.

NAVES, L.P. Metodologias para quantificar fitato e uso de fitases em rações para frangos de corte. **Dissertação de Doutorado em Zootecnia**. Universidade Federal de Lavras – MG, 2012.

RABE, M., VERDES, D., SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.162, p.87-106, 2011.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; KORNEGAY, E. T. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, Northwood, v. 6, p. 125-143, 1995.

SATO, S.S. et al. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal Microbiol Biotechnol**, v.24, p.177–187, 2013.

SCHUTYSER, M.A.I., PERDANA, J., BOOM, R.M. Single droplet drying for optimal spray drying of enzyme and probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, p.1- 10, 2012.

SELIVANOV, A.S.; Stabilization of cellulases using spray drying, **Engineering Life Science**. v.5, p.78–80, 2005.

SLOTH, J. et al. Spray drying of suspensions for pharma and bio products: drying kinetics and morphology. **Industrial and Engineering Chemical Research**. v.48, p. 3657–3664, 2009.

YOSHII, H. et al. Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray

drying. **Journal of Food Engineering**, v.87, p.34 – 39, 2008.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.