



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS DE VALOR AGREGADO
PROVENIENTES DE RESÍDUOS DE CELULOSE GERADOS DA FABRICAÇÃO DE
SALSICHA**

CLAUDIO GABIATTI JUNIOR

CARLOS PRENTICE-HERNANDEZ

Orientador

RAFAEL COSTA RODRIGUES

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS DE VALOR AGREGADO
PROVENIENTES DE RESÍDUOS DE CELULOSE GERADOS DA FABRICAÇÃO DE
SALSICHA**

CLAUDIO GABIATTI JUNIOR

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de doutor em Engenharia e Ciência
de Alimentos.

CARLOS PRENTICE-HERNANDEZ

Orientador

RAFAEL COSTA RODRIGUES

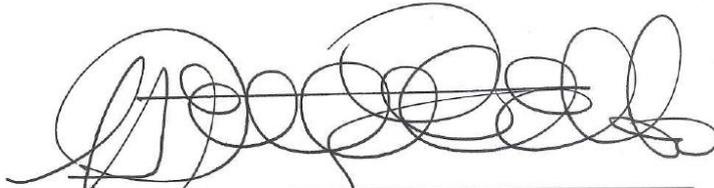
Co-orientador

RIO GRANDE, RS

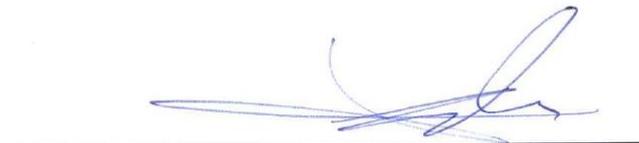
2019

APROVAÇÃO

Tese defendida por Claudio Gabiatti Junior aprovada em 01 de novembro de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



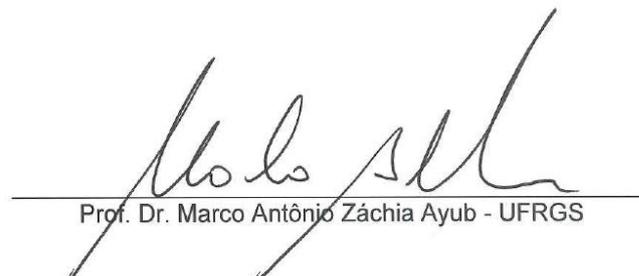
Prof. Dr. Carlos Prentice Hernández - FURG



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa - FURG



Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Salas Mellado – FURG



Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub - UFRGS



Prof. Dr. Paulo Fernando Duarte Filho - UNIPAMPA

Ficha catalográfica

G113o Gabiatti Junior, Claudio.

Obtenção e avaliação de produtos de valor agregado provenientes de resíduos de celulose gerados da fabricação de salsicha / Claudio Gabiatti Junior. – 2019.
139 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernandez.

Coorientador: Dr. Rafael Costa Rodrigues.

1. Envoltórios de Celulose 2. Hidrólise Enzimática 3. Fibra Alimentar 4. Emulsões de Carne 5. Homogeneização de Alta Velocidade 6. Açúcares Fermentescíveis I. Prentice-Hernandez, Carlos II. Rodrigues, Rafael Costa III. Título.

CDU 661.183.126

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Dedico esta tese aos meus pais, Claudio Gabiatti e Maria da Graça Pias Gabiatti, exemplos de perseverança e símbolos da educação a mim exemplar, sem os quais não alcançaria este momento único, e a minha esposa Juliana Plá de Oliveira Gabiatti, por todo o apoio e dedicação para comigo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Claudio Gabiatti e Maria da Graça Pias Gabiatti, por sempre serem os exemplos que eu sigo e seguirei, me tornando melhor a cada dia como pessoa!

Ao meu irmão Alexandre Gabiatti e minha cunhada Jaciane Neves, pelas palavras sempre oportunas em todos momentos de dificuldade que vivenciei na vida!

A minha esposa Juliana Plá de Oliveira Gabiatti, por ser esse pilar firme e forte! Mesmo tendo “entrado” na metade deste período de doutorado, sempre foi apoiadora em tudo que desempenhei do trabalho de tese ao intercâmbio. E por neste momento o qual digito os agradecimentos, ser a mãe do meu (minha) filho (a), que virá, com certeza, para alegrar ainda mais nossos dias!

Ao professor Dr. Carlos Prentice, por toda confiança, auxílio, ensinamentos e orientação nesse trabalho e por sua amizade desde os tempos da graduação!

Ao colega e hoje meu co-orientador, professor Dr. Rafael Costa Rodrigues, por toda paciência, confiança, conversas, orientações, auxílios com os textos e artigos, submissões entre tudo que desempenhou nesse período, principalmente a nossa amizade!

To my supervisor and great friend Dr. Benjamin Bohrer from University of Guelph, to accept my “crazy” project on his laboratory and for all support gave as supervisor and principally as a friend during my exchange period on Canada!

To my supervisor and friend Dr. Loong-Tak Lim from University of Guelph, make the link with Dr. Bohrer and this gave me the opportunity to be on Canada and develop a part of my thesis, with all his collaboration on the results, ways and papers!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) em especial às colegas Michele Coelho, Ju Latorres, Sibelinha, Dai e Paola, por todas as risadas e momentos vividos neste período!

A Inajara e Barbara, por mostrarem que há muita coisa alegre dentro do trabalho de doutorado, principalmente a massa à carbonara do Gustavo!

A professora Eliana Furlong, por todas conversas no “divã” da sua sala sobre tudo e sobre todos, ajudando a me formar como pessoa e profissional!

A Michele Moraes de Souza, por todas conversas, ensinamentos, cálculos, dicas e paciência!

Ao pessoal da UFRGS, no Laboratório de Biocatálise Enzimática, Lucas, Luiza e Natália por toda ajuda nos experimentos realizados e ao professor Dr. Eliezer com os experimentos de massas.

Ao Victor e ao professor Dr. Felipe Kessler por toda ajuda com experimentos!

To the Bohrer group, Kay, Amy, Aisha, Sebastian, Lydia and Sandra, for all support and friendship during my exchange period on Canada!!!

To all my “Still lurning” friends! Rosie, Ana, Gizam, Bia, Tati, Matthew, Guilherme, Nathan, Min Young, Taimoor, Shaheer and Megan!!! Remember, we always are still lurning!

To Fernanda Svaikauskas (hope write correctly) and Shane Walker, for all support in the Food Science building with the experiments and analysis and principally for they friendship during this period!

Ao Thiago, Gardenio, Chico e Dani pela parceria “da casa” no período do intercambio! To my host Paul Hintz for his friendship!

A Isabelle Neves por toda ajuda dada nos experimentos no Canadá e no nosso artigo (e primeiro publicado desta tese)!

To Carla and Art, my Canadian parents, for all support, beers, turkeys, barbecues and principally for the words and the friendship, make me feel in home!!

To the Government of Canada Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grants Program for the financial support during the exchange period.

A CAPES pela bolsa de estudo!

Em especial à Universidade Federal do Rio Grande, a qual “faço parte” há 39 anos, tendo sido criado nos corredores da mesma, devido a meu pai ser hoje professor aposentado desta instituição.

“There is nothing noble in being superior to your fellow man; true nobility is being superior to your former self.”

Ernest Hemingway

RESUMO

A salsicha é um dos produtos de carne mais consumidos no mundo e é produzida utilizando envoltórios compostos de fibras de celulose, que após o uso industrial são descartados em aterros sanitários, podendo ser uma fonte potencial de carboidratos e fibras alimentares. Tais carboidratos e fibras poderiam ser obtidos pelo processo de hidrólise enzimática. O presente trabalho teve por objetivo a obtenção de açúcares fermentescíveis e de fibras alimentares, e sua aplicação em bioprocessos e produtos alimentícios. Os envoltórios de celulose caracterizados possuem cerca de $97 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de carboidratos. Um delineamento composto central rotacional definiu como concentração de enzima $0,375 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e de substrato $34,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ como variáveis que liberaram maior teor de açúcares redutores na reação ($46,73 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína). Com estas condições, a reação de cinética enzimática revelou uma conversão de 85 % do substrato em um tempo total de 25 h e contendo $21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de glicose e $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de celobiose. Um aumento de escala de 16x foi proposto e não afetou a conversão enzimática. Os açúcares obtidos foram aplicados em bioprocessos para crescimento da bactéria *Ralstonia eutropha* e da microalga *Chlorella fusca*. No cultivo bacteriológico, apenas a glicose foi consumida e não se obteve a produção do biopolímero polihidroxialcanoatos (PHA). No crescimento da microalga, a mesma teve um crescimento acentuado nos cultivos contendo os açúcares do hidrolisado, alcançando uma concentração celular de 2,5x maior que o cultivo controle. Todos açúcares disponíveis no hidrolisado foram consumidos pela microalga. A caracterização físico-química da microalga apresentou um aumento no teor de carboidratos da mesma em comparação com o cultivo controle e a mesma não produziu PHA. A obtenção de um ingrediente de fibra alimentar foi testada, utilizando hidrólise enzimática associada a homogeneização em alta velocidade, sendo testadas as características desta fibra alimentar. Os resultados obtidos demonstraram um rendimento de fibra de 70 %, com valores em fibra alimentar total alcançando 50 % (45 % insolúvel e 5 % solúvel). A fibra obtida teve características de capacidade de ligação de água e de inchamento e dispersão de tamanho de partícula homogênea. Esta fibra foi aplicada em testes de emulsão modelo de carne bovina em substituição a um ingrediente emulsificante em diferentes níveis. As amostras de emulsão foram testadas quanto as suas características físico-químicas e tecnológicas, demonstrando uma perda nas características tecnológicas conforme se aumenta o nível de substituição do emulsificante pela fibra. Na compilação dos resultados, o trabalho atingiu seus objetivos pela obtenção de produtos de valor agregado, açúcares fermentescíveis e fibra alimentar, se utilizando como matéria prima o envoltório celulósico residual descartado na indústria de salsichas.

Palavras-chave: Envoltórios de Celulose; Hidrólise Enzimática; Fibra Alimentar; Emulsões de carne; Homogeneização de Alta Velocidade e Açúcares Fermentescíveis.

ABSTRACT

Sausage is one of the most consumed meat products in the world and is produced using casings composed of cellulose fibers, which after industrial use are disposed of in landfills and can be a potential source of carbohydrates and dietary fibers. Such carbohydrates and fibers could be obtained by an enzymatic hydrolysis process. The present work aimed to obtain fermentable sugars and dietary fibers, and their application in bioprocesses and food products. The characterized cellulose casings have about 97 g.100g⁻¹ carbohydrates. A rotational central composite design defined as enzyme concentration 0.375 U.mL⁻¹ and substrate 34.1 mg.mL⁻¹ as variables that released the highest content of reducing sugars in the reaction (46.73 mg.mL⁻¹.mg⁻¹ protein). Under these conditions, the enzymatic kinetics reaction revealed an 85% substrate conversion over a total time of 25 h and containing 21 mg.mL⁻¹ glucose and 10 mg.mL⁻¹ cellobiose. A 16x scale-up was proposed and did not affect enzyme conversion. The obtained sugars were applied in bioprocess for growth of *Ralstonia eutropha* bacteria and *Chlorella fusca* microalgae. In the bacteriological culture, only glucose was consumed and the production of polyhydroxyalkanoate biopolymer (PHA) was not obtained. In the microalgae growth, it had a marked growth in the experiments containing the hydrolysate sugars, reaching a cell concentration of 2.5x higher than the control experiment. All sugars available in the hydrolysate were consumed by the microalgae. The physicochemical characterization of the microalgae showed an increase in its carbohydrate content compared to the control experiment and it did not produce PHA. The obtaining of the dietary fiber ingredient was tested using enzymatic hydrolysis associated with high speed homogenization, and the characteristics of this dietary fiber were tested. The results showed a fiber yield of 70%, with total dietary fiber values reaching 50% (45% insoluble and 5% soluble). The obtained fiber had characteristics of water binding capacity and homogeneous particle size swelling and dispersion. This fiber was applied in beef emulsion model in replacement of a commercial emulsifying ingredient at different levels. Emulsion samples were tested for their physicochemical and technological characteristics, demonstrating a loss in technological characteristics as the level of emulsifier replacement by fiber increased. In the compilation of the results, the work achieved its objectives by obtaining added value products, fermentable sugars and dietary fiber, using as waste raw material the discarded cellulosic wrap in the sausage industry.

Keywords: Cellulose casings; Enzymatic hydrolysis; Dietetic Fiber; Beef Model Emulsions; High-speed Homogenization and Fermentable Sugars.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis utilizadas no DCCR para avaliação do processo enzimático utilizando o complexo enzimático Celluclast®.	58
Tabela 2 – Composição do meio de cultura utilizado para produção de PHA por <i>R. eutropha</i> .	62
Tabela 3 – Composição da solução concentrada de oligoelementos do meio para cultivo de <i>R. eutropha</i> .	63
Tabela 4 – Composição do meio de cultura BG11 utilizado para cultivo de <i>C. fusca</i> .	63
Tabela 5 – Composição da solução concentrada de oligoelementos utilizados para o cultivo de <i>C. fusca</i> .	64
Tabela 6 – Formulação das emulsões modelo a base de carne preparadas com a substituição do emulsificante comercial pelo ingrediente de fibra alimentar obtido.	66
Tabela 7 – Composição química proximal apresentada pelos diferentes envoltórios celulósicos.	77
Tabela 8 – Resultado experimental do delineamento composto central rotacional para complexo enzimático Celluclast® e envoltório celulósico residual como substrato.	79
Tabela 9 – Regressão para hidrólise enzimática de envoltórios de celulose residual.	80
Tabela 10 – Quantificação de açúcares redutores totais (ART), glicose e celobiose na reação de tempo de percurso com diferentes concentrações de substrato.	86
Tabela 11 – Concentração celular máxima (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e tempo de geração (T_g) do cultivo de <i>C. fusca</i> para cada cultivo.	92
Tabela 12 – Composição proximal e dados de produtividade de macromoléculas da biomassa de <i>C. fusca</i> para cada cultivo, em base seca.	96
Tabela 13 – Resultados de rendimento, umidade, açúcares redutores e conteúdo de fibras da fibra alimentar obtida utilizando o envoltório celulósico residual.	97
Tabela 14 – Capacidades de inchamento, de retenção de água (CRA) e de retenção de óleo (CRO) da fibra alimentar obtida utilizando o envoltório celulósico residual.	100
Tabela 15 – Diâmetro médio de superfície $D[3,2]$, volume médio $D[4,3]$ e parâmetros da Lei da Potência e viscosidade aparente à 100 s^{-1} (η_{100}).	101
Tabela 16 – Composição proximal e pH de emulsões de carne cozidas preparadas com ingrediente de fibra de celulose (CF).	108
Tabela 17 – Análise de perfil de textura (TPA) de emulsões de carne preparadas com ingrediente de fibra de celulose (CF).	110
Tabela 18 – Cor instrumental de emulsões de carne (cozidas e não cozidas) preparadas com ingrediente de fibra de celulose (CF).	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma geral de produção de salsichas. _____	32
Figura 2 – Envoltório celulósico na sua forma comercial (A) e após descasque no processo produtivo (B) _____	34
Figura 3 – Esquema do processo de hidrólise utilizando coquetéis de celulases. _____	36
Figura 4 - Classificação dos carboidratos não digeríveis com ênfase na solubilidade. _____	45
Figura 5 - Classificação de produtos à base de carne de acordo com materiais cárneos crus utilizados para a sua fabricação e diferentes papéis desempenhados pelos ingredientes funcionais. _____	48
Figura 6 – Parâmetros do perfil de textura (APT). _____	52
Figura 7 – Esquema do trabalho proposto para obtenção e avaliação de produtos a partir da hidrólise enzimática de envoltórios celulósicos residuais do processamento de salsichas. _____	55
Figura 8 – Equipamento utilizado para os processos enzimáticos propostos, composto de banho termostático, reator de 1000 mL e agitador. _____	59
Figura 9 – Equipamento utilizado para o aumento de escala do processo enzimático, composto de reator de 8 L e controladores. _____	61
Figura 10 – Superfície de contorno da conversão do envoltório celulósico residual em açúcares redutores. _____	80
Figura 11 – Gráfico de probabilidade normal para resíduos brutos do delineamento composto central rotacional. Y = ART (mg.mL^{-1}); X1 = concentração de enzima; X2 = concentração de substrato. R^2 = coeficiente de determinação. _____	81
Figura 12 – Comparação teórica e experimental para os valores de açúcares redutores totais do delineamento composto central rotacional. Y = ART (mg.mL^{-1}); X1 = concentração de enzima; X2 = concentração de substrato. R^2 = coeficiente de determinação. _____	81
Figura 13 – Cinética da reação de hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado pela Celluclast®. Condições de reação: 34,1 mg.mL^{-1} de substrato, 1:200 mL.mL^{-1} de enzima, pH 4,8 e 50 °C. (▲) ART; (□) Glicose e (○) Celobiose. _____	83
Figura 14 – Cinética da reação de hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado pela Celluclast® com diferentes concentrações de substrato. Condições de reação: 10; 20; 34,1; 40 e 50 mg.mL^{-1} de substrato, 1:200 mL.mL^{-1} de enzima, pH 4,8 e 50 °C. (■) 10; (●) 20; (⊕) 34,1; (⊕) 40 e (▲) 50 _____	85
Figura 15 – Cinética da reação de hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado com Celluclast® e Viscozyme®. Condições de reação: substrato 34,1 mg.mL^{-1} , enzima 1:200 mL.mL^{-1} , pH 4,8 e 50 °C. (■) Viscozyme® 100 %; (●) Viscozyme® 75 % + Celluclast® 25 %; (▲) Viscozyme® 50 % + Celluclast® 50 %; (⊕) Viscozyme® 25 % + Celluclast® 75 %; (⊕) Celluclast® 100 %; (△) Celluclast® 100 % + Viscozyme® 25 %. _____	87
Figura 16 – Cinética da reação para o aumento de escala da hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado. Comparação entre reator pequeno (PQ) e reator grande (GD). Condições de reação: substrato 34,1 mg.mL^{-1} tampão ⁻¹ , enzima 1:200 mL.mL^{-1} , pH 4,8 e 50 °C. (●) ART-PQ; (○) ART-GD; (■) Glicose-PQ; (□) Glicose-GD; (▲) Celobiose-PQ; (△) Celobiose-GD. _____	88

Figura 17 – Cinética de crescimento de <i>R. eutropha</i> e consumo de açúcares redutores. (□) Açúcar redutor cultivo glicose; (○) Açúcares redutores cultivo hidrolisado; (■) Células secas cultivo glicose; (●) Células secas cultivo hidrolisado. _____	89
Figura 18 – Cinética do crescimento de <i>C. fusca</i> LEB18 em diferentes meios de cultivo: (□) Controle; (■) 1 % hidrolisado; (▲) 5 % hidrolisado; (●) 10 % hidrolisado. □ _____	91
Figura 19 – pH dos cultivos de <i>C. fusca</i> LEB18 em diferentes meios de cultivo: (□) Controle; (■) 1 % hidrolisado; (▲) 5 % hidrolisado; (●) 10 % hidrolisado. _____	93
Figura 20 – Consumo de açúcares redutores no cultivo de <i>C. fusca</i> . (□) Controle; (■) 1 % hidrolisado; (▲) 5 % hidrolisado; (●) 10 % hidrolisado. □ _____	94
Figura 21 – Processo de obtenção e produto ingrediente de fibra alimentar obtido dos envoltórios celulósicos resíduos em suspensão pré-secagem. _____	97
Figura 22 – Distribuição do tamanho de partícula da fibra alimentar obtida utilizando envoltório de celulose resíduo. (■) 40 mg.mL ⁻¹ de substrato; (○) 50 mg.mL ⁻¹ de substrato. _____	102
Figura 23 – Viscosidade aparente da fibra alimentar obtida utilizando envoltório de celulose resíduo. (■) 40 mg.mL ⁻¹ de substrato; (○) 50 mg.mL ⁻¹ de substrato. _____	103
Figura 24 – Imagens de microscópio do ingrediente CF seco (A) com zoom de 4x e o ingrediente CF inchado (B) com zoom de 20x. _____	105
Figura 25 – Perda de cozimento apresentada pelas emulsões modelo de carne, preparadas com fibra de celulose (CF). _____	107
Figura 26 Estabilidade apresentada pelas emulsões modelo de carne, preparadas com fibra de celulose (CF). _____	107
Figura 27 – Emulsões de carne preparadas usando ingrediente de fibra de celulose (CF). T1 = 100 % CF; T2 = 75 % de CF; T3 = 50 % CF; T4 = 25 % CF e T5 = 0 % CF. _____	111
Figura A.1 – Esquema analítico para determinação de fibras alimentares solúveis e insolúveis. _____	139

ABREVIATURAS

APT = análise do perfil de textura
ART = açúcares redutores totais
CB = celobiose
CBH = celobiohidrolases
CF = ingrediente celulósico de fibra alimentar
CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência
CRA = capacidade de retenção de água
CRO = capacidade de retenção de óleo
DCCR = delineamento composto central rotacional
DNS = dinitrosalicílico
DTP = distribuição de tamanho de partícula
EC = envoltórios celulósicos
ECR = envoltório celulósico residual
ECRL = envoltório celulósico residual lavado
EG = endoglucanases
FA = Fibra alimentar
FAI = fibra alimentar insolúvel
FAS = fibra alimentar solúvel
FAT = fibra alimentar total
GD = reator de grande escala
HAV = Homogeneização de alta velocidade
HE = hidrólise enzimática
M_w = massa molecular
PF = papel filtro
PHA = polihidroxialcanoatos
PQ = reator de pequena escala
SW = capacidade de inchamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	GERAL	29
2.2	ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1	SALSICHA	31
3.1.1	Envoltórios	31
3.1.1.1	Envoltórios de celulose	33
3.2	ENZIMAS	35
3.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	37
3.4	APLICAÇÃO DE HIDROLISADOS COMO SUBSTRATO EM BIOPROCESSOS	38
3.4.1	Polihidroxicanoatos (PHA)	39
3.4.2	Microalgas	40
3.5	FIBRA ALIMENTAR (FA)	42
3.5.1	Homogeneização de alta velocidade	45
3.5.2	Caracterização das fibras alimentares	46
3.6	EMULSÕES DE CARNE	47
3.6.1	Métodos de avaliação de emulsões	50
3.6.1.1	Cor	50
3.6.1.2	Análise do perfil de textura (APT)	50
3.6.2	Incorporação de fibras em produtos cárneos	52
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	DESENVOLVIMENTO GERAL DO TRABALHO	55
4.2	MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DE AMOSTRA	55
4.3	ENZIMAS	56
4.4	MICRO-ORGANISMOS	56
4.5	REAGENTES E MATERIAIS	57
4.6	INFRAESTRUTURA	57
4.7	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	58
4.7.1	Hidrólise para obtenção de sacarídeos	58
4.7.1.1	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	58
4.7.1.2	Reação enzimática de tempo de percurso	58

4.7.1.3	Adição de segundo preparado enzimático na reação _____	59
4.7.1.4	Aumento de escala _____	60
4.7.2	Aplicação dos sacarídeos obtidos no processo de hidrólise enzimática _____	62
4.7.2.1	Crescimento de <i>R. eutropha</i> _____	62
4.7.2.2	Cultivo de <i>C. fusca</i> _____	63
4.7.3	Determinação do processo para obtenção de fibra alimentar _____	65
4.7.3.1	Obtenção do ingrediente de fibra alimentar _____	65
4.7.3.2	Aplicação do ingrediente de fibra alimentar. _____	65
4.8	METODOLOGIA ANALÍTICA _____	67
4.8.1	Determinações físico-químicas _____	67
4.8.2	Atividade enzimática _____	68
4.8.3	Análise de açúcares _____	69
4.8.4	Concentração de biomassa da alga <i>C. fusca</i> _____	70
4.8.5	Produtividade volumétrica de biomassa _____	70
4.8.6	Velocidade específica máxima de crescimento _____	70
4.8.7	Quantificação de biopolímero PHA _____	70
4.8.8	Quantificação de células secas _____	71
4.8.9	Rendimento de fibra e de secagem da fibra obtida _____	71
4.8.10	pH _____	71
4.8.11	Capacidade de retenção de água do CF _____	72
4.8.12	Capacidade de inchamento do CF _____	72
4.8.13	Capacidade de retenção de óleo do CF _____	72
4.8.14	Tamanho de partícula do CF _____	73
4.8.15	Viscosidade aparente e reologia do CF _____	73
4.8.16	Microscopia de luz _____	73
4.8.17	Perda de cozimento na emulsão modelo _____	73
4.8.18	Análise do perfil de textura das emulsões (APT) na emulsão modelo _____	74
4.8.19	Cor da emulsão modelo _____	74
4.8.20	Estabilidade da emulsão modelo _____	74
4.8.21	Análise estatística _____	75
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	77
5.1	HIDRÓLISE PARA OBTENÇÃO DE SACARÍDEOS _____	77
5.1.1	Caracterização físico-química _____	77
5.1.2	Atividade enzimática _____	78
5.1.3	Delineamento composto central rotacional (DCCR) _____	79
5.1.4	Cinética da reação de hidrólise enzimática _____	82

5.1.5	Adição de uma segunda enzima na hidrólise _____	86
5.1.6	Aumento de escala da reação enzimática _____	88
5.2	APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM BIOPROCESSAMENTO _____	89
5.2.1	Crescimento da <i>R. eutropha</i> _____	89
5.2.2	Crescimento da <i>Chlorella fusca</i> _____	90
5.3	OBTENÇÃO DO INGREDIENTE DE FIBRA ALIMENTAR _____	96
5.3.1	Rendimentos, teor de umidade, açúcares redutores e pH do CF _____	96
5.3.2	Teor de fibra alimentar do CF _____	98
5.3.3	Capacidades de retenção de água, retenção de óleo e inchamento do CF _____	99
5.3.4	Tamanho de partícula do CF _____	101
5.3.5	Viscosidade aparente e comportamento reológico do CF _____	103
5.3.6	Microscopia do CF _____	104
5.4	APLICAÇÃO DO CF OBTIDO EM EMULSÕES MODELO _____	105
5.4.1	Perda de cozimento e estabilidade de emulsão _____	105
5.4.2	Composição química proximal, conteúdo de fibra alimentar e pH da emulsão modelo _____	108
5.4.3	Análise do perfil de textura (APT) da emulsão modelo _____	109
5.4.4	Medições de cor da emulsão modelo _____	111
6	CONCLUSÃO _____	113
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	117
	ANEXOS _____	139

1 INTRODUÇÃO

A produção de salsicha possui uma diversidade durante a história em muitas culturas mundiais. Na atualidade, a combinação entre carnes e condimentos produz diferentes tipos de salsichas e diferentes categorias como frescas, defumadas, curadas e cozidas. Além disso, as salsichas cozidas podem ser divididas em dois grupos: as que consistem em uma massa cárnea homogênea e um segundo grupo que consiste na mistura de partículas visíveis, principalmente compostas de carnes e gorduras. Esta ampla variedade de salsichas é devida a diferenças na composição, forma, tamanho e as preferências culturais e tradicionais dos países (FLORES, 2016).

Para produção de salsicha são utilizados envoltórios que dão o formato ao produto, podendo estes serem naturais ou artificiais (MAROUŠEK et al., 2015). Os envoltórios artificiais são mais uniformes quanto à espessura, rigidez e forma, promovendo a saída do produto final com maior padronização (DE DAMBORENEA et al., 2007). A eliminação dos envoltórios celulósicos (EC), após o uso no processamento de salsichas, ocorre geralmente em aterros sanitários e constituem o maior resíduo orgânico produzido pelas plantas produtoras (CUMBA, 2005; SANDERS; BELYEA; TAYLOR, 2000). Gentry et al. (1996) descrevem que os EC, descartados nos aterros sanitários, contêm, principalmente na sua composição, celulose e líquidos do cozimento das salsichas, contendo proteínas, lipídios e sais. Tais resíduos celulósicos possuem o potencial para serem convertidos em produtos úteis de valor agregado, perfazendo-se de processos e operações unitárias, para obtenção de açúcares fermentescíveis ou para obtenção de fibras, as quais podem ser aplicáveis como ingrediente em produtos alimentícios.

A conversão da celulose através de hidrólise enzimática, utilizando-se de celulases, oferece um grande potencial de seletividade, baixo custo energético e condições de reação amenas comparadas aos processos de hidrólise química. Os “coquetéis de celulases” aplicados nos processos enzimáticos de despolimerização da celulose contêm grupos de hidrolases glicosídicas com efeito sinérgico entre si, as quais quebram as ligações beta 1,4 do polímero até sua redução em sacarídeos de menor massa molecular (KUBICEK; KUBICEK, 2016), possibilitando sua aplicação em processos biotecnológicos ou como ingrediente a base de fibra.

Na atualidade, há um interesse considerável no estudo da viabilidade do uso de resíduos do processamento de alimentos como matérias-primas para produção de fibras alimentares (FA). FA consistem em polímeros de carboidratos com a principal característica fisiológica ser não digeríveis no intestino delgado humano, sendo um objetivo entre a

comunidade científica, enriquecer produtos alimentícios com FA, melhorando a saudabilidade e a aceitação do consumidor (ANDERSON et al., 2009; LUO et al., 2018). Alguns estudos de modificação das várias FA usando diferentes técnicas tais quais tratamento com peróxido de hidrogênio, micronização, cozimento em micro-ondas, hidrólise química ou enzimática, homogeneização em alta velocidade ou em alta pressão.

Hidrólise química, enzimática ou enzimática-química, são atualmente utilizadas para extrair FA de diferentes fontes, sendo a enzimática a técnica reconhecida como a mais promissora e preferida (MEYABADI; DADASHIAN, 2012). É reconhecido que esta técnica promove o aumento no conteúdo de fibra alimentar solúvel (FAS) (MENG-MEI; TAI-HUA, 2016), sendo efetiva na melhoria da qualidade da FA pela quebra das cadeias de lignina, celulose e hemicelulose formando moléculas de polissacarídeos de tamanho de partícula menor (SANTALA et al., 2014). Considerando que as reações enzimáticas podem perdurar por longos períodos de tempo para alcançar a solubilidade e o tamanho de partícula desejado das FA, a combinação de tratamentos enzimáticos e mecânicos pode fornecer uma alternativa verde eficaz para a obtenção da FA (XU et al., 2015), sendo a homogeneização em alta velocidade um processo mecânico eficaz na redução do tamanho das cadeias moleculares e, em comparação com outros métodos, tem-se a vantagem do consumo de energia e tempo, porém com trabalhos científicos limitados da sua utilização (HUA et al., 2017).

O Laboratório de Tecnologia de Alimentos Universidade Federal do Rio Grande, possui uma ótima estrutura e conhecimento nos processos enzimáticos de catálise, com inúmeros diferentes trabalhos utilizando diferentes matérias-primas e enzimas. Em parceria, o Laboratório de Biocatálise Enzimática da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, possui ampla expertise em biocatálise de macromoléculas de carboidratos, fornecendo o conhecimento específico para o amplo desenvolvimento deste trabalho.

Face ao descrito acima, este trabalho teve por objetivo obter e caracterizar produtos formados pelos processos de hidrólise enzimática de resíduos de celulose regenerada gerados no processamento de salsichas, sendo estes obtidos pela hidrólise máxima do substrato para obtenção de mono e dissacarídeos ou pela hidrólise parcial aliada a técnica de homogeneização de alta velocidade para obtenção de fibras alimentares para aplicação em produtos alimentares. Os mono e dissacarídeos obtidos foram aplicados em processos biotecnológicos e as fibras alimentares obtidas foram aplicados em emulsões modelo de carne com o intuito de substituição do ingrediente emulsionante.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Obter e caracterizar os produtos formados pela hidrólise enzimática dos resíduos de envoltórios celulósicos, oriundos do processamento de salsichas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar os resíduos de envoltório celulósico;
- Determinar o melhor processo de hidrólise enzimática para obtenção de mono e dissacarídeos;
- Aplicar os açúcares obtidos na hidrólise em processos biotecnológicos;
- Desenvolver um processo de redução da cadeia de celulose dos envoltórios para obtenção de fibras alimentares;
- Caracterizar a fibra alimentar obtida;
- Aplicar a fibra alimentar obtida numa emulsão modelo de carne bovina em substituição a emulsificante comercial.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SALSICHA

A indústria de carnes produz larga variedade de produtos desde o músculo inteiro até carnes moídas e industrializados, sendo a salsicha um dos produtos à base de carne mais consumidos no mundo (BARBUT, 2016; MAROUŠEK et al., 2015). De acordo com historiadores, há registros da produção de salsichas e linguiças há pelo menos 3000 anos no antigo Egito, onde hieróglifos apontam o uso de sangue e carnes para fazer um tipo de salsicha/linguiça de carne bovina. Há também registros de produções destes produtos em países como França e Itália. Definir precisamente o que é salsicha pode ser difícil. A ampla categoria de charcutaria inclui vários tipos de salsichas, podendo ser desde simples partes de carne e gordura cortadas e temperadas até emulsionados finos. Podem também se apresentar como cozidas, defumadas, secas, curadas. Geralmente são embutidas em envoltórios naturais ou artificiais, sendo que os envoltórios celulósicos artificiais foram primeiramente introduzidos aos processadores de carne no início do século XX e utilizados para diversos produtos (ALLEN, 2015).

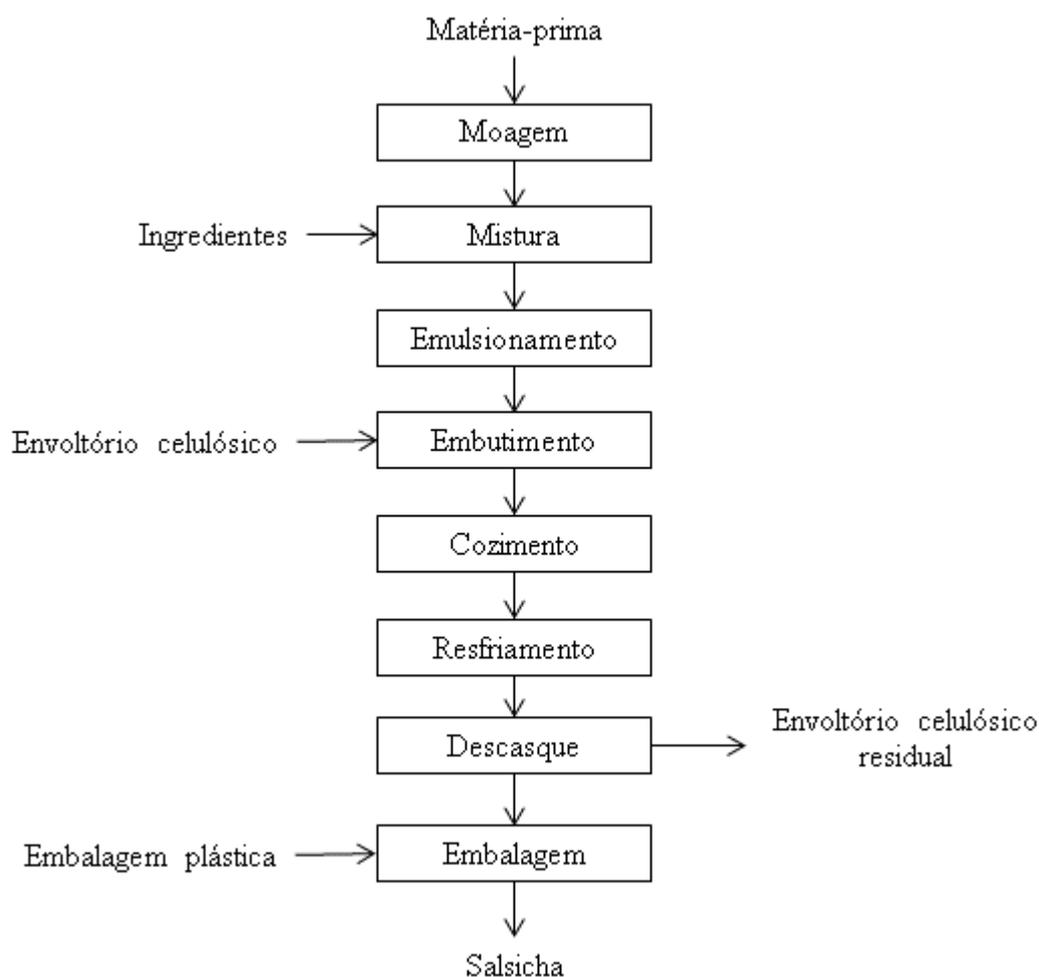
A salsicha é tipicamente definida como uma mistura de carne moída, combinada com especiarias e temperos. A salsicha é muitas vezes embutida em algum tipo de envoltório e originalmente, a salsicha era feita como um meio de recuperar valor de aparas e cortes de carne de menor valor. Além de agregar valor à carne, ao longo do tempo, produtos de salsichas cozidas tornaram-se produtos cárneos de conveniência, já que são "prontos para comer" sem nenhum preparo especial (KNIPE, 2014). Terra (2006) descreve o processo produtivo de salsicha como um processo de emulsificação de partes de carne com ingredientes não cárneos, formando uma massa firme e coesa, a qual é embutida em envoltórios a base de celulose, cozidas e/ou defumadas, resfriadas, descascadas e embaladas em sacos de polietileno para posterior venda, com seu processo produtivo demonstrado pela Figura 1.

3.1.1 Envoltórios

Os envoltórios utilizados para produção de salsicha são caracterizados por dois aspectos principais, sendo estes as suas propriedades químicas e físicas e, os seus componentes químicos que normalmente são complexos macromoleculares de polímeros. Envoltórios são peles ou membranas finas e tubulares, podendo ser naturais ou artificiais, que consistem em dois ou mais componentes, exibindo propriedades mecânicas e funcionais. Estas características dependem da massa molecular, hierarquia estrutural e a associação de seus componentes

constituintes, bem como topologia, comprimento da cadeia, sequência química e estereoquímica das moléculas poliméricas (SAVIC; SAVIC, 2016).

Figura 1 – Fluxograma geral de produção de salsichas.



Fonte: Adaptado de Terra (2006).

Os números exatos de consumo das diferentes categorias dos envoltórios de celulose são difíceis de obter, porém sabe-se que estes são consumidos em uma grande quantidade para a produção de salsichas. As salsichas são um dos produtos de carne mais consumidos no mundo e geralmente são produzidas usando envoltórios de celulose (EC) com geração anual de invólucros de celulose residuais nos Estados Unidos da América superior a 14.000 t (MAROUŠEK et al., 2015) e é um mercado que tem vendas mundiais de US\$ 392 milhões (VISKASE, 2017) e de € 734 milhões (VISCOFAN, 2017). Dados mensurados e obtidos de uma indústria mensuram que para cada tonelada de salsicha produzida geram-se 13 kg de envoltórios de celulose como resíduo, estes que são direcionados para aterros sanitários.

O aumento do consumo dos EC deu se basicamente devido as suas ótimas propriedades mecânicas, padrão de produto, facilidade de processamento, considerações de vida de prateleira e ao relativo alto custo quando se utilizar os envoltórios de animais (BAKKER et al., 1999; SAVIC; SAVIC, 2016). Também deve ser mencionado que, devido à uniformidade das famílias de EC, mais processos automatizados e mecanizados podem ser empregados em linhas de produção de alta velocidade/volume de produção.

3.1.1.1 Envoltórios de celulose

Os organismos fotossintéticos, como plantas e algas, produzem mais de 100 milhões de toneladas de material orgânico a cada ano, provindo da fixação do dióxido de carbono. Aproximadamente, metade desta biomassa é formada por celulose, um dos compostos orgânicos mais abundantes do planeta, atraindo grande interesse face a seu potencial como recurso de energia e processamento renovável (LU et al., 2019; PÉREZ; MAZEAU, 2005). Celulose e colágeno são dois polímeros naturais biodegradáveis de maior uso nas produções dos envoltórios de salsichas (MARCHELLO; GARDEN-ROBINSON, 2017).

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra e é composta por cadeias de glicose, uma excelente matéria-prima para a conversão microbiana em biocombustíveis (LYND et al., 2002; NILL; KARUNA; JEOH, 2018). Suas formas modificadas servem como fibra alimentar (FA), uma vez que não são digeridas e não contribuem com nutrientes ao passar pelo trato digestivo humano (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2009). Na forma de polpa é um recurso importante para a indústria química, sendo esta polpa utilizada para produzir produtos como derivados de celulose regenerada como termoplásticos, fibras, adesivos, etc. (SAVIC; SAVIC, 2016).

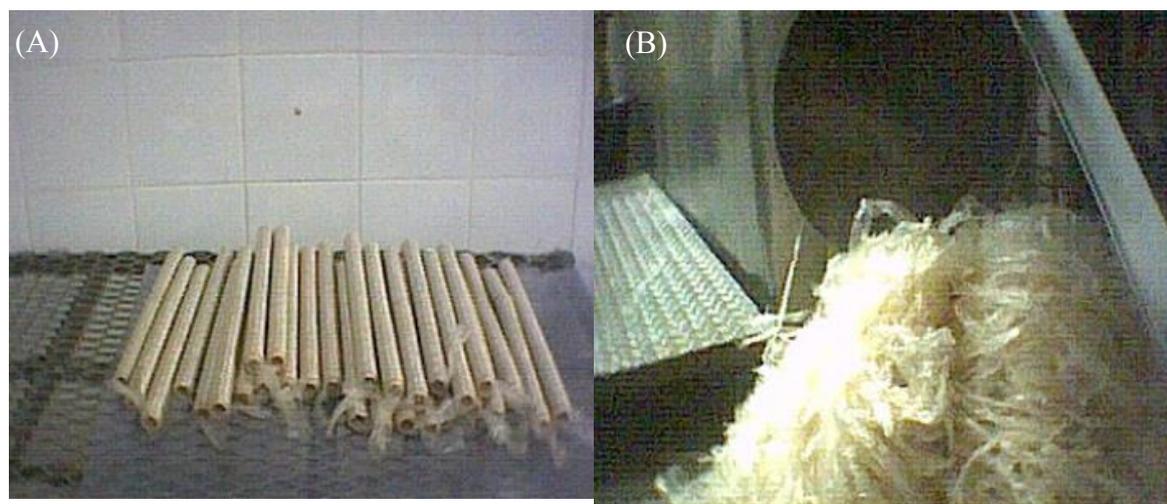
Em 1891, os cientistas britânicos Charles Cross, Edward Bevan e Clayton Beadle descobriram que as celulosas do algodão ou da madeira poderiam ser dissolvidas como xantato de celulose após tratamento com dissulfeto de carbono em meio alcalino. Em seguida, a solução foi precipitada em sulfato de amônio e posteriormente convertida em celulose usando ácido sulfúrico diluído. Essas fibras são denominadas “viscose”. No início dos anos 1900, o processo de produção de viscose foi aprimorado e comercializado (RAMAMOORTHY; SKRIFVARS; PERSSON, 2015).

Os EC são originários de plantas, obtidas das fibras de madeira ou do algodão e que, devido a sua alta resistência mecânica e maleabilidade de se ajustar as mudanças no volume do produto salsicha (expansão quando hidratado em água e sem enrugamento durante o processo de secagem), é adequado para a produção dos envoltórios de salsichas. Além destas,

possuem outras características importantes para o processamento, tais como permeabilidade ao vapor de água, fumaça e gases além de possuir maior padrão do produto e garantir uma alta higiene e segurança alimentar, em comparação com os envoltórios oriundos de animais (DJORDJEVIC et al., 2015; MIYAMOTO et al., 2010; SREENATH; JEFFRIES, 2011).

A eliminação dos EC após o seu uso no processo de salsicha ocorre geralmente em aterros, mas com o aumento da produção de salsicha, o custo de manutenção e a disponibilidade dos aterros sanitários, bem como o aumento da consciência ambiental, é necessário encontrar outras alternativas para reutilizar ou reciclar esses invólucros em produtos de valor agregado (SANDERS; BELYEA; TAYLOR, 2000). Quando descartados nos aterros, os estoques de celulose contêm, além da celulose, líquidos do cozimento da salsicha, que consiste em proteínas, lipídios e sais como nitrito e nitrato (GENTRY et al., 1996). A Figura 2 apresenta os EC na sua forma comercial e quando eliminados do processo produtivo.

Figura 2 – Envoltório celulósico na sua forma comercial (A) e após descasque no processo produtivo (B)



Existe uma necessidade econômica de as plantas de salsichas destruírem os resíduos dos envoltórios. No passado, algumas alternativas foram avaliadas, mas nenhuma delas foi implementada, tais como estudos na aplicação do EC na alimentação de ruminantes (GENTRY et al., 1996), degradação por fungos (SREENATH; JEFFRIES, 2011; SREENATH; KOEGEL, 2008), aplicação como silagem (DALPIAN, 2004) e aplicação do resíduo de celulose em bandejas pré-moldadas (GRACH, 2006). A compostagem é uma alternativa que pode ser usada para decompor o revestimento gasto, mas fatores físico-químicos, como temperatura, transferência de oxigênio, condições úmidas, controle de roedores e limitações de espaço de tratamento, tornam impraticável o tratamento no local (DALPIAN, 2004).

Outra alternativa é a combustão dos resíduos, mas as rigorosas normas federais e estaduais de qualidade do ar exigem o uso de dispositivos de tratamento de ar caros para remoção de cinzas antes da emissão de gases para a atmosfera (CUMBA, 2005). Nenhuma destas alternativas atualmente fornece uma solução econômica para o manuseio do resíduo de revestimento. A conversão de celulose por meio de hidrólise enzimática, utilizando celulases, oferece o potencial de maior seletividade, menores custos de energia e condições operacionais mais brandas do que os processos químicos (KUBICEK; KUBICEK, 2016).

A celulose e outros polímeros de carboidratos podem ser modificados estruturalmente através da sacarificação, produzindo açúcares fermentáveis, através de abordagens enzimáticas ou químicas. A conversão enzimática de biomassa celulósica pode gerar açúcares para serem utilizados em bioprocessos e/ou para aplicação na indústria alimentícia, oferecendo maiores rendimentos, maior seletividade, menores custos de energia e condições operacionais mais suaves do que processos químicos (MOHAPATRA et al., 2017; YANG et al., 2011).

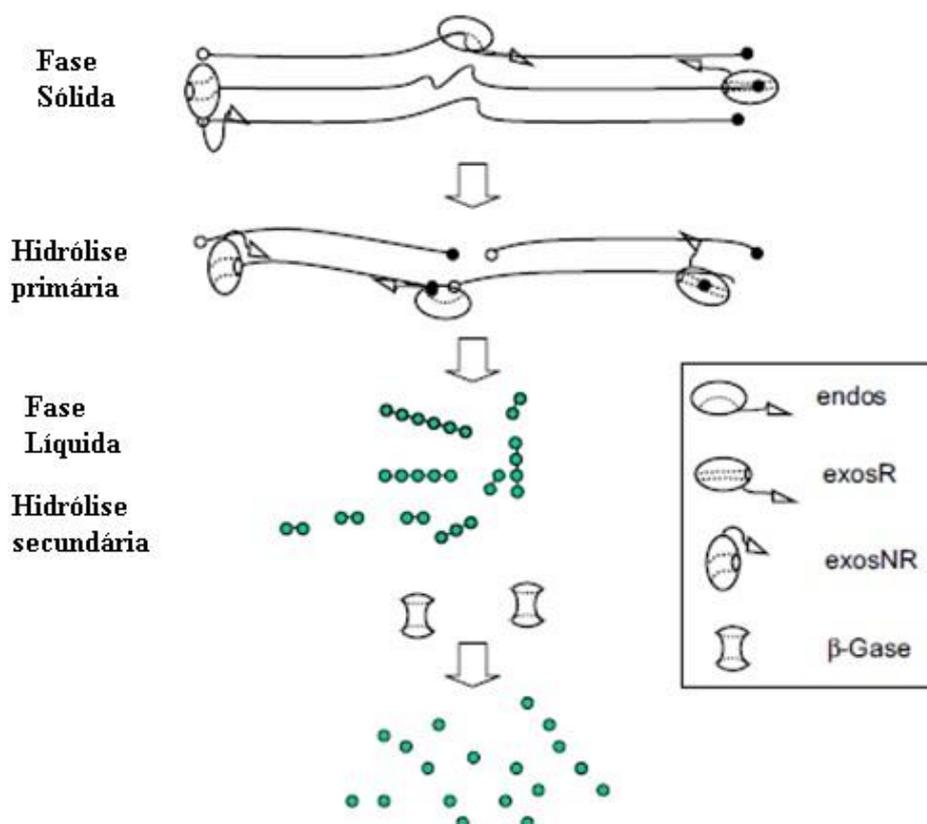
3.2 ENZIMAS

A classificação mais simples de celulases é celobiohidrolases (CBH), endoglucanases (EG) e β -glicosidases. CBH são enzimas que hidrolisam a celulose nas extremidades, ambas não redutoras (EC 3.2.1.91) ou reduzindo extremidades (EC 3.2.1.176), enquanto EG atacam cadeias de celulose em uma posição intermediária aleatória. As β -glicosidases hidrolisam a celobiose, o produto da ação dos CBH, à glicose (BARAMEE et al., 2017; JALAK et al., 2012). Inicialmente, a enzima EG atua aleatoriamente cortando as ligações β -1,4-glicosídicas acessíveis da região amorfa da celulose, produzindo novos terminais na cadeia e oligômeros cada vez mais curtos, sendo responsável pela diminuição e solubilização dos polissacarídeos. Posteriormente, as extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia de celulose (predominantemente nas regiões cristalinas) e alguns oligômeros são clivados progressivamente pelas CBH para produzir celobiose solúvel e, por último, a β -glicosidase (β -Gase) completa o processo catalisando a hidrólise de celobiose em glicose (LYND et al., 2002; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). O processo descrito está ilustrado na Figura 3.

Bommarius et al. (2008) e Martins et al. (2008) relatam que as duas enzimas atuam em sinergismo no processo a despolimerização da cadeia porque o EG aumenta a disponibilidade de extremidades da cadeia para o CBH clivar em um dissacarídeo (celobiose - CB), este que posteriormente é quebrado em unidades de D-glicose pelas β -glicosidases, reduzindo também a inibição do CBH evitando o acúmulo de CB no ambiente reacional. Igarashi et al. (2011) afirma que são necessárias pequenas quantidades de EG para promover

altos níveis de sinergismo com o CBH, que não depende apenas da razão enzimática, mas também das características do substrato como hidrofobicidade e disponibilidade da área de superfície para as interações, podendo causar o bloqueio na superfície do substrato.

Figura 3 – Esquema do processo de hidrólise utilizando coquetéis de celulases.



Fonte: Zhang; Himmel; Mielenz (2006)

As aplicações de celulases, principalmente as obtidas através do fungo *Trichoderma reesei*, são diversas, utilizando-se de diferentes substratos, porém com o intuito de sacarificar a matriz a monômeros de glicose. Alguns exemplos de aplicações em substratos são: celulose microcristalina ((LU et al., 2019), resíduos de papel de escritório (ANNAMALAI; SIVAKUMAR; OLESKOWICZ-POPIEL, 2018), casca de arroz (HENG et al., 2017), bagaço de agave (MONTROYA-ROSALES et al., 2019; SILVELLO; MARTÍNEZ; GOLDBECK, 2019), resíduos de couve-flor (MAJUMDAR et al., 2019), celulose comercial (LIM et al., 2016), farelo de trigo (ANNAMALAI; SIVAKUMAR, 2016; RODRIGUES et al., 2015), cana de açúcar (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015).

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A degradação da celulose em glicose pode ser realizada por uma reação química conhecida como hidrólise, que envolve a adição de água à molécula de celulose. Os dois métodos de hidrólise comumente usados que podem fornecer conversão de celulose quase completa em açúcares são hidrólise ácida e hidrólise enzimática (CUMBA, 2005). Muitas das estratégias para tratar tais resíduos celulósicos são tecnologias à base de enzimas (hidrólise enzimática), as quais tiveram seu uso industrial iniciado em meados do século XIX, com a aplicação em detergentes para dissolver proteínas em resíduos. Com passar do tempo, as enzimas comerciais foram evoluindo e têm recebido um nível de importância alto para o uso industrial (GARCIA-GALINDO et al., 2019).

Comparado com a hidrólise ácida, o custo de processo da hidrólise enzimática é baixo, pois esta é geralmente conduzida em condições amenas de processo (pH 4,8 e temperatura variando entre 45-50 °C) e não há possibilidade de problemas de corrosão. Além disso, baixa quantidade de subprodutos são formados, resultando em uma solução de açúcar facilmente fermentável e com bom rendimento (CUMBA, 2005). O desempenho global do processo de reação da enzima celulase com materiais celulósicos pode ser melhorado através da otimização de fatores químicos e físicos no ambiente de solução enzimática. Condições de reação como pH, temperatura, mistura e tipo de substrato celulósico e tamanho podem ser otimizadas para melhorar a taxa de hidrólise enzimática e o rendimento de glicose (SUN; CHENG, 2002).

O principal objetivo comercial da hidrólise enzimática de compostos celulósicos é a desconstrução da celulose e outros polímeros de hidratos de carbono em açúcares fermentáveis, incluindo glucose e/ou oligômeros que podem ser posteriormente convertidos em produtos valiosos através de abordagens biológicas ou químicas (YANG et al., 2011). A maioria das enzimas comercialmente usadas para ação sobre carboidratos de alimentos é hidrolítica, sendo chamadas de glicosil-hidrolases ou glicosidases. Algumas dessas enzimas podem catalisar transferência de grupos glicosil e/ou reações hidrolíticas reversas em processos de alimentos nos quais os níveis de substrato no geral são altos (30–40 % em sólidos) devido a efeitos de ação das massas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2009).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é uma reação de várias etapas que ocorre em um sistema heterogêneo. Os complexos de celulase aplicados ao processo enzimático de despolimerização da celulose e da lignina contêm um grupo de hidrolases glicosídicas com efeito sinérgico na clivagem das ligações glicosídicas do polímero (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; KUBICEK; KUBICEK, 2016). Tais enzimas são produzidas por vários

microrganismos, geralmente por bactérias como *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* (LAMSAL; SHRESTA; KHANAL, 2010; PHILIPPIDIS; SMITH; WYMAN, 1993) e fungos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicilium* (LAMSAL; SHRESTA; KHANAL, 2010; PHILIPPIDIS; SMITH; WYMAN, 1993; SUN; CHENG, 2002).

O processo de degradação enzimática da celulose pode ser resumido como os seguintes passos principais: (1) Primeiro, a enzima difunde e adsorve na superfície da celulose. (2) Segundo, uma única cadeia de celulose é quebrada (descristalinizada) a partir da superfície da fibra ordenada por uma enzima ligada para formar um complexo enzimático-substrato produtivo. (3) Finalmente, o complexo produtivo procede à hidrólise da ligação glicosídica da cadeia para produzir celobiose ou outros oligômeros de glicose (GAO et al., 2013; LU et al., 2019).

Para a hidrólise enzimática da celulose, a fonte enzimática é um ponto importante em vista da produção de enzimas e da atividade enzimática. Tem sido relatado que as celulases fúngicas têm melhor potencial que as bacterianas, sendo que os fungos *Trichoderma* e *Aspergillus* sp. estão listados como modelos para a produção de celulases (SRIVASTAVA et al., 2018). A eficiência da sacarificação enzimática é determinada por diferentes fatores, como temperatura de reação e pH. Além disso, as características de mistura e relação sólido-líquido desempenham um papel importante na reação de tempo-tempo, porque a massa e a transferência de calor são necessárias para ter uma boa interação enzima-substrato (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015; PINO et al., 2018; SAINI et al., 2016; TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

Esse complexo enzimático tem sido estudado principalmente na degradação de materiais lignocelulósicos, visando a produção de etanol. As enzimas secretadas por *Trichoderma reesei* compreendem cinco endoglicosidases diferentes, dois tipos de exoglicosidases, assim como várias xilanases e pelo menos uma enzima β -xilosidase, e também contém atividade da β -glicosidase, embora grande parte desta enzima encontre-se fixada aos micélios e não seja recuperada durante a produção industrial de celulase (ANDRIĆ et al., 2010a).

3.4 APLICAÇÃO DE HIDROLISADOS COMO SUBSTRATO EM BIOPROCESSOS

O desenvolvimento e implementação de diferentes estratégias para superar a fome e a desnutrição no mundo incluem esforços destinados a aumentar e melhorar a produção de produtos da agropecuária, que são amplamente processados para produzir produtos e derivados

através de diversas tecnologias de processamento que resultam na geração de grandes quantidades de subprodutos, criando um problema secundário de poluição que necessita de gerenciamento integral em vários níveis (YAZID et al., 2017). A biotecnologia tem sido uma das áreas mais desenvolvidas nos últimos anos devido às possibilidades inerentes de gerar soluções para diversos problemas na sociedade moderna. A gestão e valorização de resíduos agrícolas é um marco na implementação de bioprocessos nas atividades de alimentação e agricultura. As estratégias biotecnológicas nesta área estão focadas na produção de energia (ou combustíveis), biopolímeros e produtos de valor agregado, como enzimas, esporos ou outros recursos biológicos (TSOUKO et al., 2017). A economia desse processo é altamente dependente do preço do carbono no qual os micro-organismos são cultivados, e a celulose oferece o potencial como uma fonte barata e renovável de carbono (LYND et al., 2002).

3.4.1 Polihidroxicanoatos (PHA)

Os polihidroxicanoatos (PHA) são polímeros formados por cultivo microbiano como material de reserva de energia, quando há limitação de um ou mais elementos essenciais ao crescimento bacteriano. Quando há a presença de fonte de carbono, este é acumulado pelas células sob o formato do biopolímero, podendo alcançar até a 80 % da massa celular seca (KAHAR et al., 2004). Os PHA têm atraído interesse comercial como material plástico devido às suas grandes semelhanças nas propriedades físicas com os polímeros sintéticos, dentre os quais o polipropileno. As propriedades físicas e a biocompatibilidade dos PHA podem ser alteradas no processo de produção (meio de cultivo e condições de fermentação utilizados) ou ainda efetuando a mescla destes com outros polímeros, modificação da superfície dos mesmos ou combinação dos PHA com outros materiais inorgânicos, melhorando as propriedades mecânicas, possibilitando aplicações particulares destes (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010).

Os PHA são termoplásticos naturais, produzidos geralmente por bactérias, também sendo produzidos em microalgas, organismos que armazenam, sob a forma de poliéster, o carbono em excesso do meio em que se encontram, quando em condição de estresse por restrição de algum nutriente (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). O polihidroxitirato pode ser processado como um termoplástico convencional, utilizando diversas técnicas e possui diversas possíveis aplicações como embalagens, recipientes, descartáveis, todos com propriedades mecânicas muito similares aos polímeros sintéticos aplicados em plásticos, sendo bastante estável em circunstâncias de armazenamento ambiental como, por exemplo, aplicações em prateleiras e armários (KESSLER, 2014).

A variedade de PHA, com diversas composições e diferentes massas moleculares tem aumentado ao longo dos anos, com número crescente de pesquisas e patentes, em diferentes aplicações, particularmente nos campos da medicina, incrementando a relevância deste biopolímero (MENDONÇA et al., 2014). Os PHA são poliésteres termoplásticos de ácidos R-hidroxicarboxílicos, sintetizados e estocados como carbono intracelular de reserva em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, que foram expostas às condições de limitação de algum nutriente como nitrogênio, fósforo e oxigênio ou também após variações de pH (KESHAVARZ; ROY, 2010; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007; SHAH et al., 2008).

O PHA acumula-se no citoplasma sob o formato de grânulos com diâmetro entre 0,2 e 0,5 μm , que podem ser visualizados por técnicas de microscopia e que, uma vez reestabelecidas as condições de meio nutriente, provendo à célula os nutrientes limitados, estes grânulos de energia estocada são degradados e utilizados como fonte de carbono para a multiplicação celular (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

3.4.2 Microalgas

As microalgas são organismos fotossintéticos que apresentam requerimento nutricional relativamente simples. Elas geralmente crescem em suspensão na água e adotam o mesmo processo fotossintético das plantas superiores, apenas não requerendo um sistema vascular para o transporte de nutrientes e constituem um diverso grupo de organismos fotossintéticos que apresentam clorofila como pigmento fotossintético primário. Entre as principais características das microalgas estão a capacidade de converter dióxido de carbono (CO_2) e águas residuais em biomassas ricas em produtos como lipídios, carboidratos, proteínas entre outros compostos ativos alimentares (BHARATHIRAJA et al., 2015; COSTA; DE MORAIS, 2011; RAZZAK et al., 2013; SLEGERS et al., 2013; ZHU et al., 2014).

As algas fornecem uma variedade de produtos de baixo custo para consumo humano e animal (inclui o setor de aquicultura). A biomassa de microalgas possui uma rica fonte de proteína e componentes valiosos, como pigmentos, ácidos graxos ω -3, triglicerídeos que podem ser explorados por seu valor nutricional, componentes nutracêuticos e produção de biocombustíveis. (RAJA et al., 2018). As microalgas são fontes promissoras de substâncias químicas bioativas que têm benefícios para a saúde, como redução do colesterol, propriedades antiateroscleróticas ou anticâncer. Formas de dosagem populares para administração pessoal de drogas e suplementos nutricionais incluem microalgas em forma de pó ou comprimidos. A biomassa de microalgas (particularmente *Chlorella* sp.), na forma de pó foi examinada como novo ingrediente para formular comprimidos de suplementos de saúde (OSORIO-FIERROS et

al., 2017). Já na produção de combustíveis, considera-se que as microalgas irão desempenhar papel significativo no setor de energias renováveis, considerando a biomassa gerada, que apresenta grande potencial para produção de etanol, biodiesel, hidrogênio e biogás (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

As microalgas podem ser divididas em classes conforme suas características estruturais (eucariótica e procariótica) e bioquímicas, como natureza e localização dos pigmentos, carboidratos de reserva e disposição dos tilacóides. Estes micro-organismos dividem-se então nas classes *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae* (diatomáceas), *Chrysophyceae* (algas amareladas), *Cyanophyceae* (cianobactérias), *Rhodophyceae* (algas vermelhas) e *Phaeophyceae* (algas marrons) (BHARATHIRAJA et al., 2015; DERNER et al., 2006).

O carbono é um dos principais nutrientes requeridos para o crescimento das microalgas, e aparece como uma grande parcela das despesas de cultivo, podendo representar até 60 % do valor estimado do processo. Esta exigência de carbono pode ser suprida com o uso de resíduos industriais, integrais ou oriundos de transformações, transformando então o que seria considerado um problema em uma matéria-prima para obtenção de produtos de valor agregado elevado, quando são utilizados no cultivo de microalgas (COSTA; DE MORAIS, 2011). Sendo assim, a busca por fontes alternativas é considerada uma importante questão de estudo. O uso de açúcares, como as hexoses, no cultivo de microalgas, tem apresentado respostas satisfatórias no crescimento e na produção de produtos. Considerando a grande disponibilidade de resíduos lignocelulósicos, torna-se indispensável encontrar micro-organismos capazes de assimilar estes compostos, gerando biomassa com grande valor agregado (FREITAS, 2016).

É comum o emprego de meios de cultivo contendo quantidades elevadas de substâncias complexas, como extratos e hidrolisados (SCHMIDELL et al., 2001). Com o objetivo de minimizar custos de produção da biomassa microalgal e/ou seus bioprodutos, muitos estudos são realizados utilizando fontes alternativas de nutrientes, sendo as moléculas orgânicas utilizadas mais conhecidas os monossacarídeos (como glicose, frutose etc.), ácidos graxos voláteis (como ácido acético), glicerol, resíduos de indústria de laticínios e ureia (ABREU et al., 2012; ANDRADE; COSTA, 2007; CHEN; ZHANG, 1997; HEREDIA-ARROYO et al., 2011; HSIEH; WU, 2009; VIDOTTI et al., 2014). Sob condições heterotróficas e mixotróficas, algumas espécies de microalgas podem metabolizar uma variedade maior de fontes de carbono, como glicose, melão, ácido acético e ainda compostos presentes em resíduos industriais. O cultivo mixotrófico de microalgas possui o potencial de

melhorar significativamente a produção de biomassa, estimulando as receitas do cultivo industrial: isso é particularmente importante para a produção de biocombustíveis, onde a produtividade e os custos de cultivo devem ser maximizados e minimizados para serem sustentáveis (CECCHIN et al., 2018; HANNON et al., 2010; KUMAR et al., 2010; WAN et al., 2011).

3.5 FIBRA ALIMENTAR (FA)

As fibras são um dos grupos de moléculas heterogêneos da natureza devido às suas diferenças estruturais as quais dependem do tipo de monossacarídeos, mas também do tipo de ligações, do comprimento das cadeias lineares, das cadeias ramificadas, do grau de polimerização e da composição e tamanho das cadeias terminais (ELLEUCH et al., 2011; HAMAKER; TUNCIL, 2014). A classificação das FA pode variar amplamente de acordo com a origem biológica (plantas, animais, algas, fungos, bactérias ou fontes sintéticas); as características químicas (tipo de ligações e extensão das cadeias químicas); as características físicas (solubilidade e viscosidade); e as características fisiológicas (referidas à sua taxa de digestão, fermentação e efeitos no metabolismo) (EL KHOURY et al., 2012).

A FA é um componente essencial para dietas saudáveis e sua correlação positiva com a saúde humana foi difundida e estabilizada na comunidade científica (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012), podendo ser obtidas por processos enzimáticos. Os mesmos autores referenciam que os benefícios das fibras, associados com consumo adequado, traduzem uma regulação do fluxo intestinal e a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer de cólon. Macagnan; Da Silva; Hecktheuer (2016) afirmam que, com base nesses aspectos, criou-se um grande interesse na pesquisa e conhecimento das FA, em ambas as áreas, nutricionais e analíticas.

Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations; World Health Organization (2009), a FA consiste em uma cadeia polimérica de carboidratos com dez ou mais unidades monoméricas, as quais não são hidrolisadas pelas enzimas endógenas no intestino delgado de humanos seguindo as seguintes categorias: (1) carboidratos comestíveis que ocorrem naturalmente no alimento consumido; (2) polímeros de carboidratos, os quais são obtidos de matérias-primas por processos físicos, químicos ou enzimáticos, os quais demonstraram efeitos fisiológicos para beneficiar a saúde sendo demonstrado geralmente como evidência científica e aceitos pela comunidade científica e as autoridades competentes e; (3) carboidratos sintéticos, os quais demonstraram efeitos fisiológicos para beneficiar a saúde

sendo demonstrado como evidência científica, aceitos pela comunidade científica e pelas autoridades competentes.

A suplementação com FA pode resultar em alimentos saudáveis, com baixo teor calórico, baixo teor de colesterol e gordura. De acordo com as recomendações das tabelas de nutrição e alimentação do Instituto de Medicina, a média das necessidades diárias de fibra alimentar é de 25 g/dia para mulheres com menos de 50 anos; 21 g/dia para as mulheres com idade superior a 50 anos; 38 g/dia para homens com menos de 50 anos e; 30 g/ dia para homens com mais de 50 anos. A maioria dos nutricionistas e especialistas de dieta sugere que 20-30 % da ingestão diária de fibras deve vir de fibra solúvel (ELLEUCH et al., 2011; LI; UPPAL, 2010). Porém, a ingestão média de FA no mundo ainda está consideravelmente inferior do que os níveis de ingestão diária recomendados (DU; ZHU; XU, 2014; ZHANG; WANG, 2013). A ingestão média brasileira, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2011) varia entre 17,7 g e 25,8 g e é extremamente dependente da região brasileira de consumo. Especialistas e nutricionistas em dieta sugerem que a ingestão diária de fibras deve ser composta entre 20 e 30 % de fibras solúveis (ELLEUCH et al., 2011; MEHTA et al., 2015).

Atualmente, existe um interesse considerável em estudar a viabilidade do uso de subprodutos de plantas processadoras de alimentos como matéria-prima para a produção de FA. A FA consiste em polímeros de carboidratos com a principal característica fisiológica da não digestibilidade no intestino delgado humano (ANDERSON et al., 2009). Existe um objetivo entre os cientistas de alimentos em enriquecer os produtos alimentícios com FA, melhorando assim a salubridade e a aceitação do consumidor (LÓPEZ-MARCOS et al., 2015; LUO et al., 2018). Esforços têm sido feitos para modificar várias FA usando diferentes técnicas, como o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (MIŠAN et al., 2016; SANGNARK; NOOMHORM, 2003), cozimento em micro-ondas (NIETO CALVACHE et al., 2017; ZIA-UR-REHMAN; ISLAM; SHAH, 2003) e hidrólise enzimática (HE) (LUO et al., 2018; MENG-MEI; TAI-HUA, 2016; NAPOLITANO et al., 2006; WEN et al., 2017).

Métodos químicos, enzimáticos e enzimático-químicos são atualmente utilizados para extrair FA de diferentes fontes, sendo a técnica enzimática reconhecida como a tecnologia mais promissora e preferida (MEYABADI; DADASHIAN, 2012; PEERAJIT; CHIEWCHAN; DEVAHASTIN, 2012) e comprovada de ser capaz de aumentar o teor de FA solúvel (MENG-MEI; TAI-HUA, 2016), sendo eficaz na melhoria da qualidade de FA por quebra de cadeias químicas de lignina, celulose e hemicelulose que tornariam o tamanho de partícula menor (SANTALA et al., 2014).

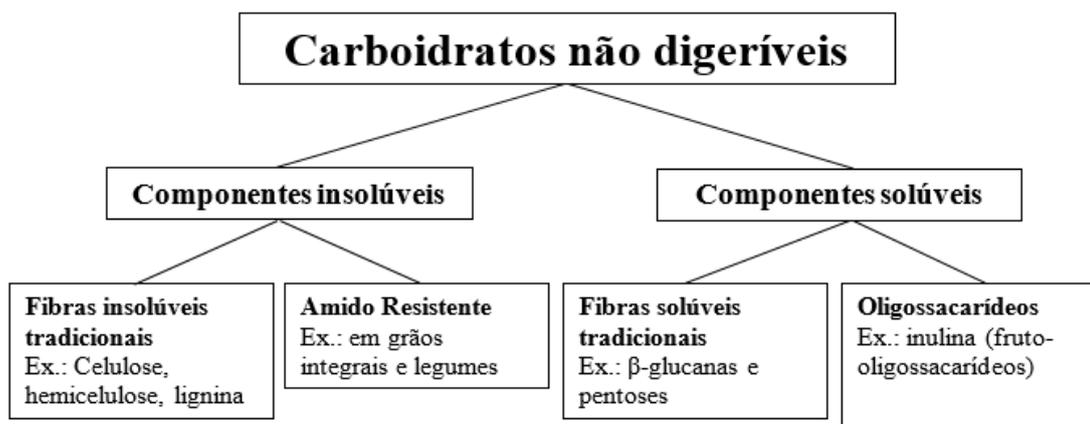
Considerando que as reações enzimáticas poderiam atuar por longos períodos de tempo para atingir a solubilidade e o tamanho desejável da fibra, a combinação de tratamentos mecânicos e enzimáticos poderia fornecer uma alternativa verde efetiva para obtenção de FA (XU et al., 2015).

A aplicação de fibras em alimentos pode alterar consistência, textura, comportamento reológico e características sensoriais dos produtos. Novas pesquisas são necessárias para determinar as quantidades de aplicação das fibras em produtos alimentícios, seus benefícios e funcionalidade. Além da aplicação nutricional, as fibras podem ser consideradas boas opções para melhoria comercial dos produtos e suas características tecnológicas como, por exemplo, desde agentes espessantes até substitutivos de gorduras (GUILLON; CHAMP, 2000). Os mesmos autores propõem que a aplicação da fibra é dependente das suas características intrínsecas, do processo que será aplicado no produto alimentício e da estrutura deste produto, sendo que as características físico-químicas das fibras desempenham um papel de extrema importância na sua funcionalidade. Algumas das características mais importantes são: dimensão da fibra, porosidade, hidratação, características reológicas e capacidades de retenção de água e de óleo.

O uso de FA pode estar diretamente ligado com o interesse em tornar o alimento mais saudável pela redução do conteúdo de lipídeos. Os lipídeos constituem importantes macronutrientes para a nutrição humana, como fonte de vitaminas e ácidos graxos essenciais, além da contribuição em aromas, suculência, aparência e textura em produtos cárneos. Porém o excessivo uso de gorduras está associado a diversas doenças como obesidade, cânceres, diabetes e doenças coronárias. Através disto, a indústria da carne tem buscado alternativas para seus produtos de baixo teor de gordura através da adição de FA, sem comprometer características sensoriais e nutricionais, diminuindo o teor de gordura dos produtos e adicionando fibras aos mesmos, tornando-os nutricionalmente mais atrativos (ZHANG et al., 2010).

Rodríguez et al. (2006) apontam que as FA podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a sua solubilidade em água: as fibras solúveis (oligossacarídeos, pectinas, β -glucanas) e as fibras insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina), conforme apresentado na Figura 4. Park; Yoon (2015) afirmam que o uso de subprodutos de processamento para obtenção de fibras é de interesse face ao seu baixo custo e disponibilidade em grandes quantidades. Também afirmam que estes subprodutos podem ser convertidos por hidrólise em novos produtos com valor agregado, liberando fibras, as quais podem ser utilizadas como ingredientes funcionais em produtos industrializados.

Figura 4 - Classificação dos carboidratos não digeríveis com ênfase na solubilidade.



Fonte: Lunn; Buttriss (2007)

3.5.1 Homogeneização de alta velocidade

A modificação das cadeias de celulose através da homogeneização por alta velocidade tem por característica efetuar a diminuição do tamanho médio das partículas das suspensões de fibras, alterando o perfil de distribuição de tamanho das moléculas, alterando os teores de fibra insolúvel e solúvel, o que confere alteração na textura e na viscosidade (WANG et al., 2018). Técnicas de redução de tamanho, como a moagem por alta velocidade, podem produzir partículas de celulose de tamanho micro ou nano, alterando suas características de estrutura e superfície e alterando consecutivamente algumas das propriedades funcionais industrialmente importantes (DUBEY; TOH; YEH, 2018).

O cisalhamento é uma técnica eficaz que pode aumentar a energia das cadeias poliméricas componentes e destruir os agregados supramoleculares. No entanto, o efeito de cisalhamento por um curto período não é suficiente para alterar as propriedades ou a mudança é indetectável. Por outro lado, até o presente pouco se sabe sobre o efeito de longo tempo de corte de alta velocidade na desagregação da cadeia de fibra. Quando a homogeneização de alta velocidade (HAV) é avaliada quanto à sua eficiência para reduzir os agregados, uma preocupação inevitável é se este método provoca a degradação do polissacarídeo, isto é, a clivagem de ligações glicosídicas em cadeias poliméricas. (CHEN et al., 2014)

Demonstrou-se que o cisalhamento mecânico é capaz de gerar energia suficiente para romper as cadeias poliméricas em cadeias de menor tamanho. Por exemplo, as moléculas de amilopectina foram degradadas sob condições mínimas de cisalhamento, como agitação suave (HAN; LIM, 2004), enquanto segundo Silvestri e Gabrielson (1991), um polímero pode ser degradado mecanicamente se o número de passagens através de um viscosímetro capilar

convencional for suficiente. Distinguir a degradação da desagregação é sempre um passo indispensável quando os cientistas avaliam a estabilidade dos polímeros. Investigações recentes com foco na conversão de fibra alimentar insolúvel (FAI) para fibra alimentar solúvel (FAS) frequentemente adotaram processos físicos.

A HAV é geralmente usada para preparar espumas, emulsões e suspensões. Durante o processamento, o meio é arrastado axialmente para dentro da folga entre o rotor e o estator, pelo que as partículas da amostra são trituradas sob fortes forças de cisalhamento e empuxo geradas pela alta velocidade de rotação (7.500 a 20.000 rpm). Em comparação com outros métodos, tem a vantagem de consumo de energia e tempo, porém com relatos limitados de fibras de processos usados no HAV (HUA et al., 2017).

3.5.2 Caracterização das fibras alimentares

A utilização e incorporação de FA em produtos cárneos estão ganhando importância dia a dia. A adequação da incorporação de fibras em produtos cárneos está aumentando devido às inúmeras propriedades funcionais, como retenção de água, lubrificação, capacidade de diminuir a perda de cozimento, modificação de textura e sabor neutro (MEHTA et al., 2015).

O termo capacidade de retenção de água (CRA) costuma ser aplicado à descrição da capacidade de uma matriz de moléculas, em geral macromoléculas presentes em baixa concentração de reter fisicamente grandes quantidades de água, de modo a inibir a exsudação sob a aplicação de forças externas em geral gravitacionais. A maioria da água encontrada em tecidos e géis pode ser classificada como fisicamente capturada, sendo que as falhas na capacidade de encapsular ou capturar a água dos alimentos exercem grandes efeitos sobre sua qualidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2009). A CRA da FA tem importantes efeitos fisiológicos no intestino delgado e no intestino grosso. A hidratação da fibra ocorre por adsorção à superfície das macromoléculas e por aprisionamento nos interstícios da matriz fibrosa ou gel (CAPRITA et al., 2010). A CRA e capacidade de inchamento, que são importantes características tecnológicas das FA, e contribuem para o aumento do volume de massa e a diminuição de calorias dos alimentos contendo fibras (LUO et al., 2017).

A capacidade da fibra para adsorver gordura ou óleo pode ser importante em aplicações alimentares; por exemplo, na prevenção da perda de gordura no cozimento e na nutrição, onde a capacidade de absorver ou ligar ácidos biliares e aumentar sua excreção está associada à redução do plasma. Esta capacidade depende das propriedades de superfície da fibra, da densidade de carga total, da espessura e da natureza hidrofóbica da partícula de fibra. A capacidade de ligação de óleo/gordura avalia a capacidade das FA para evitar a perda de

gordura ou óleo durante o processamento de alimentos e reduzir os níveis de colesterol sérico pela ligação de gordura ou óleo no sistema de digestão humana (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

A viscosidade e as características do gel podem ser medidas a partir de uma dispersão de água (ou fluido gástrico simulado) do próprio FA ou de uma dispersão da matriz alimentar que incorpora o FA. Embora seja essencial saber exatamente quais materiais de FA estão presentes nos alimentos de teste, os dados físicos no FA, por si só, abordam apenas parte da questão. A viscosidade depende da fração líquida e da concentração, forma, tamanho e flutuabilidade das partículas de alimentos (LENTLE; JANSSEN, 2010). A viscosidade é definida como a resistência ao fluxo. A capacidade do FA para produzir soluções viscosas após a dissolução na água depende de sua massa molecular (M_w) e concentração (DIKEMAN; FAHEY, 2006). Para a maioria dos fluidos, uma equação de “lei de potência” se aplica, e recomendamos obter a curva de fluxo completa ao longo de um intervalo de taxa de cisalhamento e relatar os parâmetros da equação (K e n), conforme equação 1, pois isso permitirá o cálculo da viscosidade aparente em qualquer taxa de cisalhamento e valor de interesse. Além disso, para facilitar a comparação com outras pesquisas, é útil observar a viscosidade aparente em taxas de cisalhamento como 10 ou 50 s, que têm sido comumente relatadas na literatura para refletir as condições corporais. (POUTANEN et al., 2017).

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

3.6 EMULSÕES DE CARNE

Dentre os alimentos de origem animal, a carne é um dos mais representativos porque contribui com diferentes nutrientes necessários para satisfazer as exigências metabólicas e, portanto, é um fator importante na obtenção de uma nutrição adequada (MCAFEE et al., 2010; WEISS et al., 2010). O consumo de carne também está associado a questões de preferência, tradição, a aspectos de custos, praticidade e versatilidade.

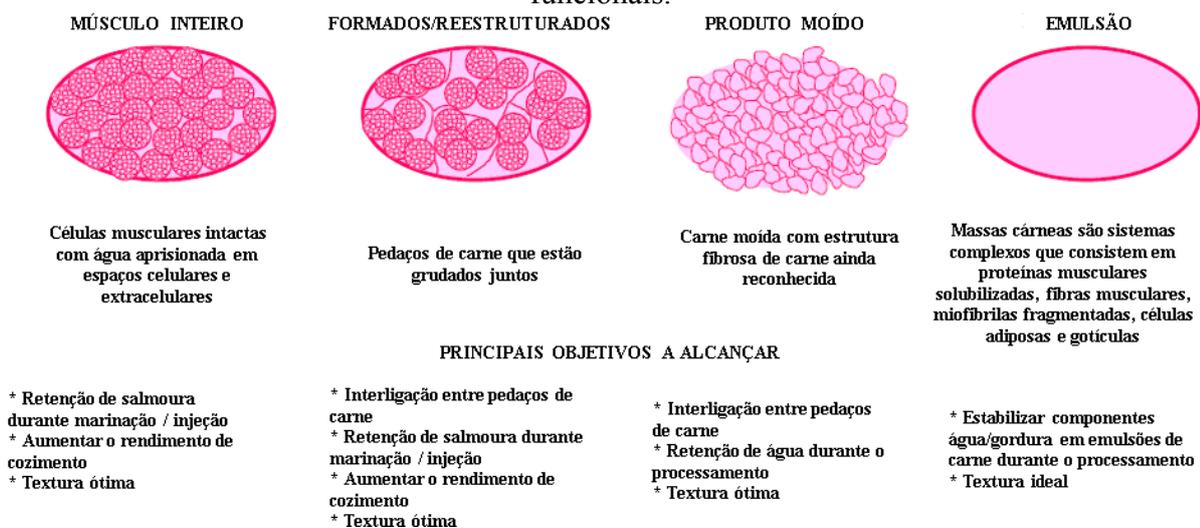
O mercado de derivados cárneos prontos para consumo e cozidos tem se expandido rapidamente nos últimos anos e tornou-se a principal forma de comercialização de produtos de carne para muitos países. Com o passar dos anos, os consumidores estão se tornando cada vez mais conscientes dos problemas de saúde relacionados à dieta, portanto, exigentes quanto a ingredientes naturais seguros e que tragam benefícios à saúde. No caso de carnes e produtos cárneos, as exigências dos consumidores focam na redução do teor de gordura, colesterol e baixos conteúdos de cloreto de sódio e nitritos, o que tem melhorado a composição do perfil de

ácidos graxos e aumentou em todo o mundo a possibilidade de incorporação de compostos funcionais (ÁVILA et al., 2014; ZHANG et al., 2010).

O processo de fabricação de massas cárneas picadas inclui, normalmente, a cominuição, a mistura, a formagem, a embalagem e, posteriormente, o resfriamento. Segundo Tornberg (2005), na estrutura destes tipos de produtos, as fibras da carne permanecem mais ou menos intactas e são distribuídas aleatoriamente, em comparação com a estrutura anisotrópica bem definida de todo o músculo. No caso de salsichas e outros derivados emulsionados, a fabricação inclui ainda emulsificação por ação física da carne, com adição de água, sais e outros aditivos, em um equipamento específico (*cutter* ou emulsificador) para homogeneizar a massa. Nestes produtos, altas quantidades das proteínas miofibrilares são extraídas e, quando aquecidas, criam uma rede proteica densa, que retém a água de forma eficiente por forças capilares.

Petracci et al. (2013), indica que a adição de ingredientes funcionais na carne ajudaria a modificar as características tecnológicas deste sistema. Estes ingredientes podem ser sais, fosfatos ou citratos, (para ajudar a aprimorar a funcionalidade das proteínas musculares) ou amido, farinhas de cereais (fibras) e hidrocolóides, bem como proteínas vegetais. Os ingredientes que se poderiam usar nestes produtos dependem do tipo de carne, da técnica de produção e da intenção proposta para o produto final, como apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Classificação de produtos à base de carne de acordo com materiais cárneos crus utilizados para a sua fabricação e diferentes papéis desempenhados pelos ingredientes funcionais.



Fonte: Petracci et al. (2013)

Tipicamente uma emulsão é formada por duas fases líquidas imiscíveis, onde a emulsificação consiste na dispersão de um fluido em outro através da criação de uma interface.

Em uma emulsão cárnea, os glóbulos de gordura são dispersos e estabilizados em uma matriz aquosa constituída por proteínas miofibrilares, segmentos de fibras musculares e vários outros ingredientes. A natureza anfifílica das proteínas permite a sua capacidade de formação de película. A porção hidrofílica atua na água e a porção hidrofóbica atua na interface entre a gordura e a fase contínua (TERRA, 2006).

Com a redução das partículas e extração das proteínas musculares, a formação de uma membrana flexível e viscoelástica em torno dos glóbulos de gordura é essencial à estabilidade da emulsão. Durante a emulsificação, a miosina e actomiosina são preferencialmente adsorvidas na interface água-gordura. Neste sistema, as proteínas estão presentes em três fases distintas: a matriz de proteína, a fase aquosa e a película interfacial da proteína. Os tipos e quantidades de proteínas presentes em cada fase influenciam nas propriedades de textura e a estabilidade dos produtos cozidos. O filme interfacial que encapsula os glóbulos de gordura e uma adequada distribuição de gordura e proteína ao longo da interface é favorável à estabilidade (MANDIGO; SULLIVAN, 2014). Os mesmos autores comentam que nas emulsões cárneas com quantidades excessivas de proteína na fase contínua a flexibilidade do produto diminui, pois reduzem as interações proteína-proteína e a gelificação adequada durante o cozimento. Os produtos com gordura reduzida exigem aumento de ingredientes não cárneos para melhorar a funcionalidade, especialmente para a ligação da água adicional.

A obtenção de alimentos funcionais abrange dois aspectos principais: de um lado, a seleção e caracterização de componentes bioativos, criação e desenvolvimento da tecnologia de aplicação e a avaliação dos fatores que modificam o conteúdo e a biodisponibilidade do composto no alimento desenvolvido; de outro lado, a avaliação dos efeitos funcionais *in vitro* ou *in vivo* que fornecem informações sobre os mecanismos de ação, o impacto sobre a função de resposta (dose resposta *in vivo*) e os efeitos agudos e crônicos (AGGETT et al., 2005; HOWLETT, 2008).

Segundo Cortés, Chiralt e Puente (2005), um dos fatores mais importantes para o sucesso de qualquer programa de incorporação de nutrientes aos alimentos é a seleção do alimento matriz. Nem todos os alimentos podem ser fortificados, embora seja possível tecnicamente. Além disso, nem todos os nutrientes podem ser adicionados, uma vez que, a estabilidade no interior da matriz do alimento e os efeitos sobre a natureza e qualidade do mesmo são fundamentais na viabilidade do processo. Assim, a seleção do composto funcional deve garantir: estabilidade, biodisponibilidade de nutrientes sob condições de uso e de armazenamento, manutenção das características sensoriais, ser economicamente viável na indústria de processamento e permitir a sua utilização em quantidades normais regularmente.

Já Olmedilla-Alonso, Jiménez-Colmenero e Sánchez-Muniz (2013) exemplificam que a carne e os derivados cárneos são um excelente meio para o consumo de compostos bioativos, sem mudanças nos hábitos alimentares, devido à quantidade e frequência de consumo, à contribuição para a ingestão diária de diferentes nutrientes, à diversidade de apresentações, à possibilidade de alterar a sua composição e ao uso de ingredientes não cárneos de alta aceitação pelos consumidores.

3.6.1 Métodos de avaliação de emulsões

3.6.1.1 Cor

A cor é considerada como o atributo de qualidade mais importante da carne fresca na hora da compra, enquanto a maciez, flavor e suculência da carne são os atributos mais importantes para as carnes cozidas (AMSA, 2012; JOO et al., 2013). A cor da carne é dada principalmente pelo tipo de fibra muscular e o teor de mioglobina no músculo. A descoloração da carne depende, principalmente, da taxa de oxidação da oximioglobina (JOO et al., 2013).

Em músculos de bovino entre o 1º e 2º anos de idade, encontram-se cerca de 5 mg de mioglobina por grama de músculo. Em carnes de ovinos com a mesma idade, por sua vez, encontra-se somente a metade do valor e em suínos só a quinta parte ou menor quantidade (LAWRIE, 2005). Em geral, aceita-se que as mudanças da cor resultam das mudanças na mioglobina. Autores indicam que a cor final da carne fresca é sempre uma mistura das formas oximioglobina (contém O₂, cor vermelho brilhante), mioglobina (forma reduzida, Fe²⁺, cor vermelho roxo) e metamioglobina (oxidada - Fe³⁺, responsável pela tonalidade marrom-cinza) e no caso da globina desnaturada a cor é acinzentada (BARBUT, 2016; FEINER, 2006).

Para medição da coloração de carnes e produtos à base de carne é utilizado em geral o sistema de escala de cor da Comissão Internacional de Iluminação (CIE L*a*b*), segundo método descrito pela CIE-Lab (SCHANDA, 2007). As coordenadas desse sistema tridimensional são: luminosidade (L*), que é acromática e varia de 0 (preto) a 100 (branco); e as coordenadas a* e b* onde a* = coordenada do verde-vermelho (-a*: verde, +a*: vermelho); e b* = coordenada azul-amarelo (-b*: azul, +b*: amarelo)

3.6.1.2 Análise do perfil de textura (APT)

O comportamento reológico, incluindo as características da textura de produtos à base de carne pode ser avaliado por vários métodos mecânicos como compressão, torção, tensão

ou cisalhamento (ÁVILA et al., 2014). Segundo Belew et al. (2003), os vários fatores que influenciam a maciez da carne são a proteólise post-mortem, o teor e distribuição de gordura intramuscular (ou marmoreio), a presença e teor de tecido conjuntivo e o estado contrátil do músculo. Esses fatores também influenciam a sensibilidade e percepção de maciez entre diferentes músculos dentro da mesma carcaça em bovinos.

As mudanças *post-mortem* possuem influência importante na maciez das carnes, principalmente influenciadas pelas proteínas miofibrilares. Quando os músculos encurtam substancialmente no início do rigor, a velocidade de amaciamento da carne é mínima. O grau de encurtamento do sarcômero durante o rigor mortis depende da temperatura e da taxa de diminuição do pH. Outro fator determinante na maciez da carne é a extensão da proteólise sob as proteínas estruturais, fato intimamente relacionado à atividade das calpaínas (LAWRIE, 2005).

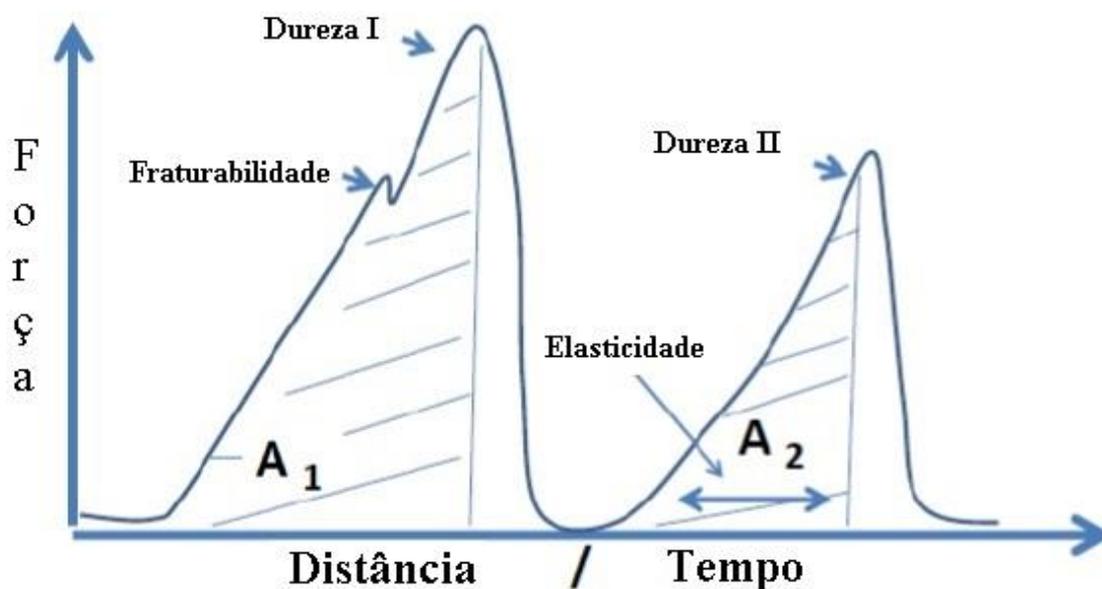
Alguns métodos objetivos para avaliar a firmeza da carne incluem: a utilização do instrumento de cisalha Warner-Bratzler e o equipamento de Ensaio Universal Instron. A Warner-Bratzler mede a força necessária para cisalhar e cortar uma amostra cilíndrica de 1 mm de espessura em libras ou quilogramas. Assim, quanto maior a força de corte, maior a firmeza. Os fatores que mais influenciam este método são: a intensidade do cozimento, a uniformidade da amostra, a direção das fibras musculares, o teor de tecido conectivo e a temperatura da amostra (ÁVILA et al., 2014; HOLMAN et al., 2015).

De acordo com a American Meat Science Association Educational Foundation - AMSA (AMSA, 2015), obter amostras (corpos de prova) uniformes é a variável mais crítica nas medidas de textura com a lâmina Warner Bratzler (WB). As amostras devem ser de diâmetro uniforme e aquelas que apresentam defeitos óbvios do tecido conjuntivo devem ser eliminadas. Adicionalmente, as amostras devem ser mantidas a temperatura de refrigeração para conservar sua consistência. O método Warner-Bratzler tem sido bastante utilizado por vários pesquisadores na área de carnes para estimar a firmeza da carne (BELEW et al., 2003; DESTEFANIS et al., 2008; GIRARD et al., 2012; HOLMAN et al., 2015). Porém, outros pesquisadores preferem realizar análises de perfil de textura (APT) para avaliar outros parâmetros importantes como a coesividade, firmeza e elasticidade. Segundo Barbut (2016), o APT é um dos métodos mais populares para medir a textura da carne, sendo os seus principais parâmetros apresentados na Figura 6.

O teste de APT é um dos métodos de teste mais populares para uma variedade de produtos alimentícios (por exemplo, carne, produtos assados, laticínios e géis hidrocolóides) e foi desenvolvido no início dos anos 60. Baseia-se em uma compressão de dois ciclos, em que

uma amostra cilíndrica é comprimida duas vezes até um ponto de deformação predeterminado (BARBUT, 2016). O APT tem apresentado alta correlação com os testes sensoriais tanto em carnes quanto em embutidos (ÁVILA et al., 2014; HUIDOBRO et al., 2005). Os parâmetros derivados da análise de APT são obtidos em cada um dos dois ciclos de compressão, utilizados para descrever atributos sensoriais, sendo a firmeza (força - N) na primeira compressão e os demais obtidos pelo pico 2 da Elasticidade (distância no segundo pico - A2) e suas interações como: Coesividade = A_2/A_1 ; Gomosidade = Firmeza I x coesividade; Mastigabilidade = Gomosidade x elasticidade.

Figura 6 – Parâmetros do perfil de textura (APT).



Fonte: Barbut (2016).

3.6.2 Incorporação de fibras em produtos cárneos

Algumas estratégias vêm sendo avaliadas por diferentes autores em relação ao desenvolvimento de produtos cárneos com apelo saudável. Entre elas está o uso de ingredientes funcionais (fibras, proteínas vegetais, antioxidantes naturais) (CARBALLO; COFRADES; JIMENEZ-COLMENERO, 2001; WEISS et al., 2010). Os ingredientes não cárneos obtidos desde uma ampla variedade de fontes vegetais e animais são rotineiramente usados na fabricação de produtos cárneos por suas propriedades funcionais, incluindo emulsificação, CRA, capacidade de ligação de gordura, melhoria da textura e aparência (PIETRASIK; JARMOLUK, 2003). A fibra, quando adicionada a produtos cárneos, tem características desejáveis como CRA, substituto de gordura, agente de texturização, assim como, emulsificante

e estabilizantes na formação de espumas e emulsões, bem como ingrediente funcional para ingestão humana (BURKUS; TEMELLI, 2000; LIU et al., 2015; LYLY et al., 2004; PIÑERO et al., 2008; WEISS et al., 2010). A ciência tem relatado diversos estudos na adição de diferentes concentrações de prebióticos, fibras alimentares e ingredientes com alto teor de fibras em diversas formulações de produtos cárneos frescos, cozidos e fermentados (ÁLVAREZ; BARBUT, 2013; RAMÍREZ et al., 2002; SARTESHNIZI et al., 2015; TAHMASEBI et al., 2016).

A literatura apresenta alguns trabalhos com adição de fibras em produtos cárneos, tais como Grigelmo-Miguel; Abadías-Serós; Martín-Belloso (1999) que adicionaram FA de pêssego em salsichas tipo frankfurters, aumentando a viscosidade, diminuindo o pH e melhorando o rendimento de cocção; García et al. (2002) verificaram que a adição de fibras de cereais (aveia e trigo) e de frutas (pêssego, maçã e laranja) melhoraram as características de dureza e coesividade em salsichas fermentadas com baixo teor de gordura; Fernández-López et al. (2008) adicionaram fibra de laranja em salsichas fermentadas “tipo espanhola” e verificaram a diminuição de nitritos e melhora no processo fermentativo do produto através de alterações no pH, atividade de água e níveis de nitrito e nitrato; Cardoso; Mendes; Nunes (2008) utilizaram a fibra de ervilhas e de raízes de chicória para melhorar a resistência do gel e a dureza em salsichas de pescado, sem alterar os parâmetros de cor e de textura do produto original; Archer et al. (2004) estudaram que a adição de fibra de tremoço em salsichas tornaram o produto mais saciante do que o produto padrão, além de afirmar que a gordura ingerida era menor no produto contendo fibra.

Outros trabalhos com adição de fibras são: Choi et al. (2009) que adicionaram fibras em salsichas como substituinte de gorduras; Sáyago-Ayerdi; Brenes; Goñi (2009) aplicaram fibras de uvas com capacidade antioxidante em hambúrgueres, em níveis de 2 %, sem impacto negativo na qualidade sensorial; outros estudos indicam que a adição de mais de 10 % de fibra alimentar não causou impacto significativo na análise sensorial de hambúrgueres (PINHO et al., 2011), empanados de carne (PIÑERO et al., 2008) e em salsichas (CHOE et al., 2013).

A Universidade de Guelph em suas linhas de pesquisa tem efetuado trabalhos com adição de fibras e em emulsões modelos, tendo como exemplos o efeito da inulina, β -glucana e suas misturas em produtos emulsionados cozidos (ÁLVAREZ; BARBUT, 2013); a otimização da adição de β -glucanas em sistemas de emulsionados de carne (MEJIA et al., 2018); a substituição de amidos por adição de β -glucanas, celulose microcristalina e a combinação de ambas em emulsões modelo de carnes (MEJIA; DE FRANCISCO; BOHRER, 2019). A mesma instituição possui também trabalhos em ciência da carne, como adição de farinhas de jaca em

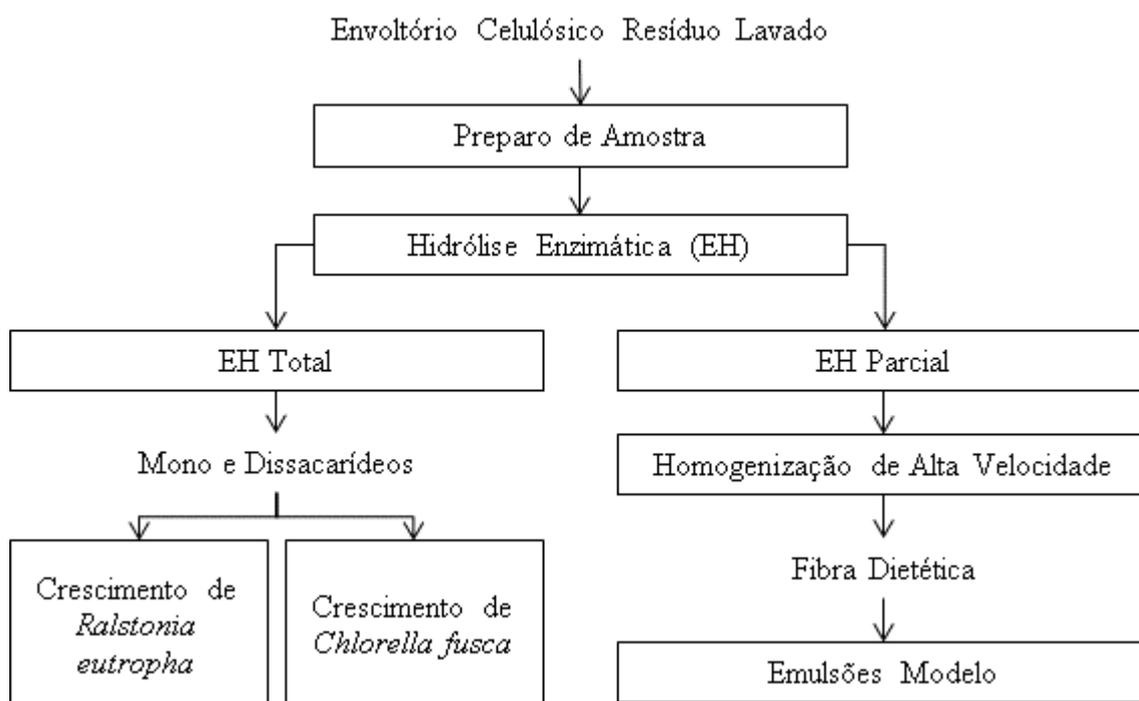
produtos cominutados (HUANG; BOHRER, 2019); aplicação de β -glucanas em peito de frango e seu comportamento durante a estocagem (MEJIA et al., 2019a) e o efeito de diferentes sais nas características tecnológicas de emulsões a base de carne (MEJIA et al., 2019b).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO GERAL DO TRABALHO

O trabalho proposto está organizado em procedimentos unitários exibidos na Figura 7. Os procedimentos experimentais e analíticos para cada etapa do trabalho proposto são descritos nos itens em sequência.

Figura 7 – Esquema do trabalho proposto para obtenção e avaliação de produtos a partir da hidrólise enzimática de envoltórios celulósicos residuais do processamento de salsichas.



4.2 MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DE AMOSTRA

O EC Residual (ECR) foi coletado no interior da indústria, logo após o descasque da salsicha. Foi embalado em sacos de polietileno, selado a vácuo e congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sacos foram transportados para o LTA em caixas de poliestireno e depois armazenados em congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O ECR foi triturado ainda congelado em moinho de facas (TE-650, TECNAL, PIRACICABA, BRASIL) e foi lavado com água destilada resfriada ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por várias vezes para remover resíduos do processo de salsicha e identificado como ECR lavado (ECRL). A lavagem para remoção de lipídios e cinzas se baseia na metodologia da variação de pH para obtenção de proteínas solúveis, conforme descrito por Nolsøe e Undeland (2009). Após a lavagem, o ECRL foi seco em estufa com circulação de ar a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h, moído por segunda vez em moinho de facas (TE-633, TECNAL, PIRACICABA, BRASIL) e peneirado com

peneira de 4,5 mm e embalado em sacos de polietileno. Os sacos foram congelados a -18 °C e mantidos congelados até o uso.

Para comparação da caracterização do envoltório antes e pós uso industrial, o envoltório celulósico (EC) foi fornecido por uma indústria processadora de carne do Estado do Rio Grande do Sul. O EC foi coletado diretamente das caixas recebidas do fornecedor e levado imediatamente em recipiente fechado ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), à temperatura ambiente. O EC foi armazenado à temperatura ambiente e posteriormente cortado com tesoura em pedaços menores de 4,5 mm antes da utilização.

4.3 ENZIMAS

Os complexos de celulase utilizados neste trabalho foram Celluclast® 1.5L, produzidos pelo fungo *Trichoderma reesei* ATCC 26921 e Viscozyme® L, produzido pelo fungo *Aspergillus* sp. Ambos são compostos de endo e exoglucanases e de β -glucosidases e foram gentilmente cedidos pela empresa LNF Latino Americana, localizada em Bento Gonçalves, RS, Brasil. Para qualificação das enzimas, foi efetuado análise da atividade enzimática. Tais enzimas foram utilizadas face estarem presentes no acervo do laboratório, bem como a facilidade de cedência por parte da empresa LNF.

4.4 MICRO-ORGANISMOS

A bactéria utilizada para aplicação dos hidrolisados para obtenção de PHA foi *Ralstonia eutropha* ATCC17699, gentilmente cedida pela Fundação André Tosello de Campinas - SP. A bactéria foi mantida em ágar nutriente sob refrigeração a 4 °C. A composição do meio é de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar bacteriológico.

A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. As microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 vieram de tanques de assentamento de cinzas na Usina Termelétrica Presidente Médici, que usa carvão como combustível (DUARTE et al., 2017).

4.5 REAGENTES E MATERIAIS

Os padrões utilizados nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (glicose, celobiose, celotriose e celotetraose) foram todos adquiridos da Sigma Aldrich. Todos os demais reagentes utilizados foram padrão analítico.

A carne bovina de origem comercial (músculo *semimembranoso* – umidade 66,4 %; proteína 18,3 %; lipídios 14,7 % e cinzas 1,1 %) foi cortada em cubos, misturada e depois moída grossa (8 mm) usando um moedor de carne industrial (MASTER 90 Y12, SIRMAN, MARSANGO, ITÁLIA). Amostras de 1 kg foram embaladas a vácuo e armazenadas a -20°C até uso posterior.

Os sais (cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio, nitrato de sódio e eritorbato de sódio) foram obtidos de um fornecedor de ingredientes comerciais (HERMAN LAUE SPICE COMPANY INC.; UXBRIDGE, ONTÁRIO, CANADÁ). O agente emulsionante comercial (farinha de trigo, ingredientes a base de leite modificado e sal) foram supridos pela Hela Spice Canada In. (Uxbridge, ON, Canada) e o azeite de oliva (Kirkland Signature, Costco Wholesale, Issaquah, Washington, USA) foi fornecido por mercado local.

4.6 INFRAESTRUTURA

Para o desenvolvimento do trabalho proposto na parte de hidrólise enzimática e obtenção de sacarídeos, foram utilizadas como infraestrutura as dependências do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) e o Laboratório de Processamento de Pescado (LPP). Para aplicação dos hidrolisados obtidos nos crescimentos de *R. eutropha* e *C. fusca* e suas caracterizações foram utilizadas como infraestrutura as dependências do LTA, do Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) e do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB). Todas as dependências supracitadas pertencem à Escola de Química e Alimentos (EQA), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizada na cidade do Rio Grande, RS, Brasil. Para a quantificação de mono e dissacarídeos foram utilizadas as dependências do Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Para o desenvolvimento do trabalho proposto na parte de hidrólise parcial e obtenção, caracterização e aplicação das fibras de celulose foram utilizadas as dependências do Meat Science Lab, do Dairy Lab, do Cereal Lab e do Packaging and Biomaterial Lab, sendo todas as dependências pertencentes ao Food Science Building, localizado na University of Guelph (UoG), cidade de Guelph, Canadá, em parceria com o programa Emerging Leaders in

the Americas Program (ELAP) da Global Affairs Canada, sob a orientação dos professores Dr. Benjamin Bohrer e Dr. Loong-Tak Lim.

4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.7.1 Hidrólise para obtenção de sacarídeos

4.7.1.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Foi realizado um DCCR de duas variáveis (2^2) para determinar as melhores condições de reação da hidrólise enzimática utilizando a enzima Celluclast® e o substrato proposto ECRL. O delineamento consistiu em quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e quatro repetições no ponto central, totalizando 12 experimentos. As variáveis propostas foram a concentração de enzima (v:v) e a concentração de substrato (m:v) tendo como resposta a concentração de açúcares redutores (ART) obtida em mg.mL^{-1} por mg de proteína do preparado enzimático após 1 h de reação. A matriz utilizada para o DCCR é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis utilizadas no DCCR para avaliação do processo enzimático utilizando o complexo enzimático Celluclast®.

Variáveis codificadas	Variáveis reais	
	Concentração Enzima (v enzima:v tampão)	Concentração Substrato ECRL (mg.mL^{-1} de tampão)
-1,41	1:341	5,9
-1	1:300	10
0	1:200	20
+1	1:100	30
+1,41	1:59	34,1

Os ensaios foram realizados em reator de vidro de 250 mL acoplado a banho termostático (QUIMIS-SOLOTEST, Q212S, DIADEMA, BRASIL), utilizando 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol.L^{-1} para manter o pH em 4,8 e temperatura de reação controlada em $50 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 200 rpm (FISATOM, MOD. 715, SÃO PAULO, BRASIL). Todos os ensaios foram realizados durante 1 h.

4.7.1.2 Reação enzimática de tempo de percurso

A reação enzimática de tempo de percurso foi realizada utilizando um reator de vidro encamisado de 500 mL (MARCONI, MA259/MR, PIRACICABA, BRASIL) acoplado a banho termostático (QUIMIS-SOLOTEST, Q212S), com temperatura controlada em $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e tampão citrato 50 mmol.L^{-1} para manter o pH constante em 4,8, sob agitação de 200 rpm. A

Figura 8 apresenta o equipamento utilizado para realizar as reações enzimáticas de tempo de percurso. A concentração de enzima utilizada foi de $0,375 \text{ U.mL}^{-1}$ de tampão, conforme definido anteriormente no DCCR. Cinco ensaios foram realizados variando a concentração do substrato de 10; 20; 34,1; 40 e 50 mg.mL^{-1} de tampão e utilizando o complexo de celulases Celluclast®.

Em cada ensaio, foram coletadas amostras no intervalo de hora em hora, e foi mensurado o total de ART (mg.mL^{-1}) pelo método descrito por Miller (1959). Em todos os ensaios foi quantificado o total de mono e dissacarídeos (glicose e celobiose) utilizando cromatografia líquida de alta performance para conhecer o perfil de açúcares ao final da reação.

Figura 8 – Equipamento utilizado para os processos enzimáticos propostos, composto de banho termostático, reator de 1000 mL e agitador.



4.7.1.3 Adição de segundo preparado enzimático na reação

Utilizando-se também da melhor condição do DCCR (concentração de enzima de $0,375 \text{ U.mL}^{-1}$ de tampão e concentração de substrato de $34,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de tampão), a fim de

tentar melhorar a conversão do material celulósico em glicose, foram realizados testes adicionando-se um segundo preparado de celulasas. O preparado Viscozyme® foi adicionado ao início da reação substituindo o preparado Celluclast® no volume de enzima nas proporções de 0, 25, 50, 75 e 100 %. Também foi efetuado o teste adicionando à reação contendo 100 % da enzima Celluclast®, 25 % do total de enzima (em volume) do preparado Viscozyme®. A reação enzimática foi realizada utilizando um reator de vidro encamisado de 500 mL (MARCONI, MA259/MR) acoplado a banho termostático (QUIMIS-SOLOTEST, Q212S), com temperatura controlada em 50 °C e tampão citrato 50 mmol.L⁻¹ para manter o pH constante em 4,8, sob agitação de 200 rpm.

Em cada ensaio, foram coletadas amostras no intervalo de hora em hora e foi mensurado o total de ART (mg.mL⁻¹) pelo método descrito por Miller (1959). Em todos os ensaios foi quantificado o total de mono e dissacarídeos (glicose e celobiose) utilizando cromatografia líquida de alta performance para conhecer o perfil de açúcares ao final da reação.

4.7.1.4 Aumento de escala

Um aumento de escala do processo enzimático foi proposto para verificar se haveria alguma alteração nos resultados obtidos em escala laboratorial. Para efetuar o aumento de escala, a agitação tem de ser calculada para garantir o mesmo movimento de líquidos na mistura, perfazendo o movimento igual de suspensão dos sólidos na hidrólise enzimática nos diferentes reatores. Para o cálculo da agitação, foram utilizadas as equações (2 e 3) descritas por Geankoplis (1998) abaixo, considerando o reator em formato cilíndrico.

$$R = \left(\frac{V_2}{V_1} \right)^{1/3} \quad (2)$$

$$N_2 = N_1 \left(\frac{1}{R} \right)^n \quad (3)$$

Onde R é a razão do aumento de escala, V1 é o volume útil do reator menor (0,2 L) e V2 é o volume útil do reator do aumento de escala (4 L), N2 é a agitação para o aumento de escala, N1 é a agitação utilizada no reator menor e “n” é a constante das características do fluido, sendo utilizada para este caso a razão $n = 3/4$ para sólidos em suspensão. O valor de N2 calculado foi de 100 rpm e aplicado no aumento de escala conforme segue.

A reação enzimática de tempo de percurso foi realizada utilizando um reator de vidro com capacidade total de 8L (BIO-TEC-FLEX, TECNAL) com encamisamento elétrico para aumento da temperatura e controle automático de fluxo para manutenção da mesma

constante no fluido. A Figura 9 apresenta o equipamento utilizado para efetuar a avaliação do aumento de escala.

A reação utilizou 4 L de tampão citrato de sódio 50 mmol.L^{-1} para manter o pH em 4,8, com temperatura constante de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação calculada de 100 rpm. A concentração de enzima utilizada foi a mesma definida pelo DCCR ($0,375 \text{ U.mL}^{-1}$ de tampão) e de substrato de $34,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de tampão. As enzimas adicionadas obedeceram ao percentual de 75 % do volume total de enzima para o preparado de celulasas Celluclast® e de 25 % para o preparado de celulasas Viscozyme®. Uma amostra foi sacada a cada hora da reação e testada para ART utilizando a metodologia descrita por Miller (1959), determinando a quantidade de açúcares redutores por mL de reação. Foram também quantificados os teores de glicose e celobiose a cada hora utilizando-se de CLAE.

Figura 9 – Equipamento utilizado para o aumento de escala do processo enzimático, composto de reator de 8 L e controladores.



4.7.2 Aplicação dos sacarídeos obtidos no processo de hidrólise enzimática

4.7.2.1 Crescimento de *R. eutropha*

O hidrolisado obtido foi aplicado em processo fermentativo para obtenção de polihidroxialcanoatos (PHA). A bactéria utilizada foi *R. eutropha* ATCC 17699. A linhagem foi mantida em meio ágar nutriente (NA) sob refrigeração a 4 ° C. A composição do meio é de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar bacteriológico. O hidrolisado obtido foi concentrado utilizando-se de rotaevaporador (MOD. 344.2, QUIMIS) acoplado a um banho de aquecimento (MOD. 550, FISATOM) até que o mesmo chegasse à proporção de açúcares conhecidos que, ao ser diluído, perfizesse 30 g.L⁻¹ de ART no meio de cultura (cerca de 300 mL). O processo fermentativo para obtenção de PHA obedeceu ao descrito no trabalho de Aragão et al. (1996) e modificado por Rodrigues (2005). Como pré-cultura, foi utilizado meio nutriente (NB) possuindo a composição de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne em Erlenmeyer aletado de 250 mL. A pré-cultura de 100 mL foi inoculada com 3 alçadas da bactéria e disposta em agitador rotatório (TE-424, TECNAL) com temperatura de 30 °C, rotação de 180 rpm pelo período de 48 h para crescimento.

O cultivo foi realizado em Erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura. A composição do meio de cultura obedeceu a Tabela 2. O teor de nitrogênio (Sulfato de Amônio) foi dosado pela proporção de 7,5:1 de Carbono:Nitrogênio a fim de criar a restrição de nutriente para que a bactéria acumule a fonte de carbono sob a forma de PHA. Foram realizados dois cultivos simultâneos, um contendo como fonte de carbono o hidrolisado obtido e o outro como padrão com meio sintético de glicose na mesma concentração de ART, ao qual se apresentava o hidrolisado na diluição final (300 mL).

Tabela 2 – Composição do meio de cultura utilizado para produção de PHA por *R. eutropha*.

Componente	Concentração g.L ⁻¹
Citrato ferroso de amônia	0,06
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,10
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,67
Solução de oligoelementos ^a	1 mL
Na ₂ HPO ₄	3,54
KH ₂ PO ₄	1,50
Fonte de Carbono (hidrolisado ou glicose sintética)	34

^a A composição da solução concentrada de oligoelementos é demonstrada na Tabela 3.

Durante o processo fermentativo, a cada 8 h foram sacadas alíquotas para análise do mesmo, composto de 2 mL para a quantificação de sacarídeos por cromatografia líquida de alta performance, 4 mL para quantificação do biopolímero e duas alíquotas de 2 mL para quantificação do total de células secas, todas metodologias descritas no item **4.8 – Metodologia Analítica**.

Tabela 3 – Composição da solução concentrada de oligoelementos do meio para cultivo de *R. eutropha*.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01

Fonte: Aragão et al. (1996)

4.7.2.2 Cultivo de *C. fusca*

Foi utilizada a microalga *C. fusca* LEB 111 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016), pertencente à coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, com concentração inicial do inóculo 0,2 g.L⁻¹. A microalga *C. fusca* foi cultivada em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979) conforme exposto na Tabela 4 e 5.

Tabela 4 – Composição do meio de cultura BG11 utilizado para cultivo de *C. fusca*.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
Nitrogênio - NaNO ₃	1,500
K ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,040
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0,006
Carbono - Na ₂ CO ₃	0,020
C ₆ H ₈ O ₇	0,006
Solução de oligoelementos ^a	1,0 mL.L ⁻¹

^a A composição da solução concentrada de oligoelementos é demonstrada na Tabela 5.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreator do tipo Erlenmeyer de 1000 mL contendo cerca de 800 mL de cultivo, pelo período de 10 dias. Para avaliação do hidrolisado foram efetuadas três diferentes concentrações de hidrolisado no cultivo como fonte de carbono

em substituição ao NaCO_3 do meio, sendo estas 1; 5 e 10 % (v:v) correspondendo a 8; 40 e 80 mL do volume total do cultivo. Também para o cultivo utilizando o hidrolisado, o meio BG11 foi modificado para 50 % do teor de nitrogênio do meio (NaNO_3). Como controle foi utilizado o meio padrão completo, conforme as Tabelas 4 e 5. Os ensaios com a microalga *C. fusca* LEB 111 foram expostos à iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W em estufa termostaticada a 30 °C e realizados em duplicata com fotoperíodo de 12 h. Para seu controle foram retiradas amostras diárias para quantificação da concentração celular, segundo Costa et al. (2002), mensuração do pH, determinação de açúcares redutores totais pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, segundo protocolo de Miller (1959) e determinação de sacarídeos por CLAE.

Tabela 5 – Composição da solução concentrada de oligoelementos utilizados para o cultivo de *C. fusca*.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
H_3BO_3	2,860
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,049
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,810
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido com uso de centrifuga refrigerada (SUPRA 22K, HANIL, CORÉIA DO SUL) a 9000 g, 20 °C e 20 min, ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada por 10 min nas mesmas condições de temperatura e centrifugação, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi congelada em ultra freezer (IULT90D, INREL, LONDRINA, BRASIL) por 48 h a -80 °C e posteriormente liofilizada (L108, LIOTOP, SÃO CARLOS, BRASIL) a -55 °C e 50 μmHg durante 48 h. As amostras liofilizadas foram mantidas em freezer a -20 °C para posterior caracterização quanto ao teor de proteínas, lipídios, carboidratos e teor de PHB.

Para as análises de proteínas e carboidratos foi realizada a medida a partir de extratos preparados com 5 mg de biomassa da microalga e 10 mL de água destilada, sonicados com sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA), com 10 ciclos de funcionamento, sendo 1 min ligado e 1 min desligado. Este procedimento foi utilizado para liberar o material intracelular da microalga *C. fusca* LEB 111 no meio líquido.

4.7.3 Determinação do processo para obtenção de fibra alimentar

4.7.3.1 Obtenção do ingrediente de fibra alimentar

Para obtenção do ingrediente de fibra alimentar (CF), o ECRL foi submetido primeiramente a um processo enzimático utilizando o preparado enzimático Celluclast 1.5L®. Duas concentrações de ECRL foram escolhidas para este estudo após testes preliminares com diferentes concentrações (entre 30 e 60 mg.mL⁻¹ de tampão). As concentrações escolhidas foram 40 e 50 mg.mL⁻¹ de tampão e suas massas foram tomadas em béqueres e adicionado 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ para manutenção do pH em 4,8. Os béqueres foram colocados em agitadores magnéticos com aquecimento (THERMO FISHER SCIENTIFIC, OTTAWA, ON, CANADA) e até que a temperatura da mistura alcançasse 50 °C, quando 0,375 U.mL⁻¹ de tampão do preparado enzimático foi adicionado. A reação permaneceu por 6 h com agitação constante (200 rpm) e então toda a amostra contida no béquer foi homogeneizada em um homogeneizador de alta velocidade (POWERGEN 1000, THERMO FISHER SCIENTIFIC) por 5 min, sendo 1 min com a velocidade de 7500 rpm, 3 min com a velocidade de 12000 rpm e 1 min com a velocidade de 7500 rpm. Por conseguinte, a solução do CF obtida foi acondicionada em placas de Petri plásticas previamente taradas, para posterior processo de secagem. O CF então foi seco em liofilizador (GENESIS FREEZE DRIER, VIRTIS, USA) a -40 °C com 200 mTorr por 48 h, sendo após de retirado, moído em gral com auxílio de pistilo, e acondicionado em potes de plástico e mantidos em dessecador.

Para caracterização do CF obtido foram realizadas mensurações de rendimento de FA, rendimento de secagem, umidade, açúcares redutores, teor de FAI e FAS, pH, capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo, capacidade de inchamento, viscosidade aparente por reologia e tamanho de partícula, todos descritos no item **4.8 – Metodologia analítica**.

4.7.3.2 Aplicação do ingrediente de fibra alimentar.

Antes da preparação das emulsões, as amostras de carne moída foram descongeladas sob refrigeração (4±1 °C) por pelo menos 16 h. Emulsões de carne bovina (umidade 66,4 %; proteína 18,3 %; lipídios 14,7 % e cinzas 1,1 %) foram preparadas seguindo a metodologia proposta por Mejia; Francisco; Bohrer (2019) com modificações, nas formulações e quantidade preparada. Cinco emulsões de base de 300 g contendo carne bovina (de acordo com o nível de fibra ou emulsificante comercial incorporado), água (20 %), azeite (15 %) e sais (2 %) foram fabricados com três repetições independentes. O CF foi adicionado

em substituição do emulsificante comercial nos níveis de 0, 25, 50, 75 e 100 % do emulsificante total, conforme apresentado na Tabela 6. As amostras contendo apenas o emulsificante foram consideradas como amostras de controle.

As emulsões foram completamente preparadas em homogeneizador alimentar (NINJA®BL780C, MISSISSAUGA, ONTÁRIO, CANADÁ). O primeiro passo da preparação da emulsão foi misturar a carne bovina, sais (sal comercial, nitrato, tripolifosfato e eritorbato) com 50 % da água (gelo) por aproximadamente 30 s (até a solubilização das proteínas da carne). O próximo passo foi a adição do azeite de oliva seguido por 20 s de mistura. Em seguida, o correspondente nível de fibra ou emulsionante para cada respectivo tratamento, foi adicionado à emulsão. Este passo foi imediatamente seguido com a adição dos restantes 50 % da água e depois 30 s de mistura até se obter uma massa homogênea. Ao longo do processo de emulsificação, a temperatura da mistura de carne foi inferior a 10 °C, conforme assegurado pelo monitoramento da temperatura inicial da carne e pela substituição de metade da água por gelo. As emulsões foram embutidas em tubos de centrífuga de 50 mL para serem cozidas e uma parte foi colocada em placas de Petri para medições de cor crua.

Tabela 6 – Formulação das emulsões modelo a base de carne preparadas com a substituição do emulsificante comercial pelo ingrediente de fibra alimentar obtido.

	Tratamento ¹				
	100%CF	75%CF	50%CF	25%CF	0%CF
Carne Bovina, %	57,00	57,15	57,30	57,45	57,60
Água, %	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Gordura ² , %	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
CF, %	6,00	4,50	3,00	1,50	0,00
Emulsificante comercial % ³	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
Sal comercial %	1,45	1,30	1,15	1,00	0,85
Tripolifosfato de sódio, %	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Nitrato de sódio %	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Eritorbato de sódio %	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ CF = ingrediente de fibra alimentar

² Azeite de oliva

³ Emulsificante comercial (Farinha de trigo, Ingredientes modificados de leite e sal).

O cozimento foi efetuado em banho termostático (VWR, VWR INTERNATIONAL, USA) com temperatura inicial da água de 50 °C. Em um dos tubos de centrífuga foi inserido um termômetro para controle de temperatura. Quando a temperatura interna da emulsão alcançou 50 °C (cerca de 25 min), a temperatura do banho foi aumentada para 80 °C, onde os tubos permaneceram até que alcançassem a temperatura interna de 72 °C.

Após isso, os tubos foram acondicionados em banho contendo água e gelo para resfriamento e foram armazenados sob refrigeração para posteriores análises.

As emulsões modelo foram caracterizadas quanto a sua perda de cozimento, seu perfil de textura (dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade), cor da emulsão crua e cozida (L, a, b, Hue e Chroma), composição proximal (umidade, proteína, lipídios e cinzas), teor de fibra alimentar (insolúvel e solúvel), pH e estabilidade de emulsão.

4.8 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.8.1 Determinações físico-químicas

A composição centesimal realizada nos envoltórios celulósicos e das emulsões modelo obedeceu as normas da AOAC (2000a) conforme os protocolos abaixo. Para o teor de umidade das amostras analisadas utilizou a metodologia nº 950.46 de ensaio em estufa a 105 °C. Para análise de lipídios utilizou-se a metodologia de Soxhlet nº 991.36. A análise de proteínas dos envoltórios celulósicos seguiu o procedimento de micro Kjeldahl nº 920.87. A análise de proteínas das emulsões modelo seguiu o método de Dumas, utilizando analisador de proteína/nitrogênio LECO TruMac FP-528, (LECO CORP ST. JOSEPH, MI, EUA), com EDTA como padrão conhecido e aplicando o fator de conversão 6,25 conforme método nº 990.03. Para determinação de cinzas foi utilizado o método de incineração e mufla nº 923.03.

Para determinação de lipídios da biomassa de alga *C. fusca* foi utilizada metodologia colorimétrica descrita por Marsh e Weinstein (1966) utilizando uma curva padrão de tripalmitina entre 0 e 0,3 mg.mL⁻¹. A determinação de proteínas da biomassa de alga *C. fusca* foi determinada através da metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão uma curva de albumina de soro bovino entre 0 e 160 µg.mL⁻¹.

A determinação de carboidratos dos envoltórios celulósicos seguiu o protocolo NREL/TP-510-42618, conforme descrito por Sluiter et al. (2010), onde o envoltório passou por hidrólise ácida e seus açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta performance. A determinação de carboidratos da biomassa de alga *C. fusca* seguiu o protocolo de carboidratos totais por fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) utilizando como padrão glicose.

Para análise de fibra alimentar total, foi utilizado o roteiro de análise do fornecedor Megazyme, que utiliza a metodologia AOAC 991.43 de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel em alimentos (AOAC, 1995). O procedimento consiste em adicionar 500 mg da amostra em 40 mL de tampão MES-TRIS 50 mmol.L⁻¹ com pH 8,2 e agitar magneticamente para

homogeneização. Os Erlenmeyer foram colocados em banho de água a 100 °C e foi adicionado 50 µL da enzima α -Amilase, agitando a cada 2 min durante 30 min. Após este tempo, os Erlenmeyer foram passados para banho aquecido a 60 °C para diminuir a temperatura. Foram lavadas as paredes internas dos frascos com 10 mL de água destilada e auxílio de espátula e sendo então adicionado 100 µL da protease (Subtilisina) aos frascos, mantendo os mesmos no banho a 60 °C, agitando a cada 2 min durante 30 min de incubação. Finalizado o período, a solução teve seu pH ajustado para 4,1-4,8 utilizando ácido clorídrico (HCl) 0,561 M e os frascos foram devolvidos para o banho com temperatura de 60 °C, onde foram adicionados 200 µL da enzima amiloglucosidase (de *Aspergillus niger*), agitando a cada 2 min durante 30 min de reação. Finalizada a reação enzimática, o material foi filtrado em cadinhos sinterizados contendo cerca de 1 g de Celite (previamente secos e tarados). O filtrante foi lavado com álcool etílico 95 % e acetona, identificado com fibra alimentar insolúvel (FAI) e foi reservado para posterior análises. O volume de filtrado foi mensurado e então adicionado 4x do valor do volume em álcool etílico 95 % aquecido a 60 °C para precipitação da fibra insolúvel, durante 120 min à temperatura ambiente. Após o período, o líquido foi filtrado em cadinhos sinterizados contendo cerca de 1 g de Celite (previamente secos e tarados). O filtrante foi lavado com álcool etílico 78 %, álcool etílico 95 % e acetona, consecutivamente e identificado como fibra alimentar solúvel (FAS) e foi reservado para posterior análises.

Cada procedimento foi realizado por quatro vezes para gerar uma duplicata de análise de fibras, face que cada rotina descrita acima gera 1 cadinho para cada e se necessita analisar proteína e cinzas de ambos. Os cadinhos (FAI e FAS) foram secos em estufa a 105 °C durante a noite e foi calculada sua massa. Após isto, cada cadinho teve o teor de proteína e de cinzas mensurado. A análise de proteína foi realizada pelo método AOAC número 990.03, denominado determinação de nitrogênio por combustão de Dumas, utilizando equipamento modelo TruMac, LECO Corp (St. Joseph, MI, EUA), utilizando EDTA como padrão externo e fator de multiplicação 6,25. Para análise de cinzas, foi utilizado o mesmo método anteriormente descrito. Os valores de FAI, FAS e FAT foram calculados, utilizando planilha automática fornecida pela Megazyme. O procedimento de análise de fibra é demonstrado na Figura A1 nos anexos.

4.8.2 Atividade enzimática

Os preparados de celulasas utilizadas para o processo enzimático (Celluclast® e Viscozyme®) tiveram suas atividades enzimáticas totais medidas, utilizando-se a metodologia proposta por Ghose (1987) com modificações. A mistura enzimática foi previamente diluída na

proporção de 1 mL de enzima para cada 500 mL em tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 4,8. Foram avaliados dois substratos: papel filtro (PF) e ECRL. Adicionou-se 1 mL da solução de enzima em cada tubo contendo 50 mg do substrato. A reação foi conduzida a 50 °C durante 5 min sob agitação e os açúcares redutores totais liberados (ART) foram determinados com ácido dinitrosalicílico (DNS), de acordo com a metodologia recomendada por Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 µmol de açúcar redutor, expresso em glicose, por minuto, sob as condições de reações estipuladas.

4.8.3 Análise de açúcares

Para análise de ART foi utilizada a metodologia descrita por Miller (1959), onde 1 mL da solução contendo açúcares foi misturado com 1 mL da solução contendo DNS (ácido dinitrosalicílico, hidróxido de sódio e tartarato duplo de sódio e potássio) em ebulição (100 °C) por 5 min, posto em banho de água e gelo para cessar a reação e efetuada a leitura em espectrofotômetro (IL592, IONLAB, ARAUCÁRIA, BRASIL) a 540 nm. Os resultados obtidos da absorbância foram comparados com uma curva padrão de glicose que variou de 0 a 0,6 mg.mL⁻¹.

Para determinação de açúcares totais da biomassa da alga *C. fusca* foi utilizada a metodologia descrita por Dubois et al. (1956), onde uma amostra do extrato de alga sonificado obtido foi misturado com fenol e ácido sulfúrico para reação colorimétrica, sendo esta lida a 480 nm e comparada sua leitura com uma curva padrão de glicose de 0 a 100 µg.mL⁻¹.

A quantificação de sacarídeos foi realizada utilizando cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE) da marca Shimadzu (TOKYO, JAPÃO), equipado com detector de índice de refração (RID) utilizando coluna Synergi 4µ Hydro-RP 80A C-18 (250 x 4,6 mm). Água ultrapura foi utilizada como fase móvel com vazão de 0,5 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40 °C. Todas as amostras foram filtradas antes da injeção com filtro de celulose 0,22 µm. Como padrões, foram utilizados glicose, celobiose, celotriose e celotetraose. A leitura foi comparada a uma curva padrão de glicose e de celobiose de 0 a 2,5 mg.mL⁻¹.

Para confirmação dos resultados obtidos no CLAE-RID, as amostras finais foram analisadas em CLAE acoplado em sistema de espectrometria de massas (CLAE-MS) marca Shimadzu (TÓQUIO, JAPÃO). O sistema CLAE-MS possui um analisador de tempo de voo quadrupolo (q-TOF) e uma fonte de ionização por electrospray (ESI), equipamento marca Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII (Bremen, Alemanha). As condições de corrida e os padrões foram as mesmas utilizadas para a performance da análise de CLAE-RID.

4.8.4 Concentração de biomassa da alga *C. fusca*

A concentração celular da alga *C. fusca* foi realizada por monitoramento diário via espectrofotometria (UV-MINI 1240, SHIMADZU, KYOTO, JAPÃO) em comprimento de onda 670 nm, sendo os dados correlacionados a com curva padrão previamente determinada de *C. fusca* LEB 111, relacionando o peso seco e a densidade ótica correspondente, como descrito por Costa et al. (2002).

4.8.5 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade máxima de biomassa foi determinada conforme Equação 4, onde X_t é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d) (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$P_{\max} = \frac{X_t - X_0}{(t-t_0)} \quad (4)$$

4.8.6 Velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica máxima foi determinada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica do crescimento.

4.8.7 Quantificação de biopolímero PHA

A concentração de biopolímero na biomassa foi determinada por cromatografia gasosa (CG) nos tempos propostos de reação (a cada 8 h) no crescimento da bactéria *R. eutropha* e em três tempos (0, 5 e 10 d) para o crescimento da alga *C. fusca* LEB111. As amostras obtidas no cultivo com a bactéria *R. eutropha*, um volume conhecido de meio de cultura foi centrifugado a 8667 g por 10 min e lavado por duas vezes com água destilada para limpeza das células. Já para as amostras de biomassa da alga *C. fusca* LEB111, foram utilizados 15 mg de biomassa submetida à extração dos pigmentos com álcool metílico 99,8 % (v:v), de acordo com o método de extração de pigmentos proposto por Lichtenthaler (1987), sendo a biomassa, após a retirada do pigmento, seca em estufa à 105 °C por 24 h.

Após isto, ao precipitado foi adicionado 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico, para hidrólise do polímero e metanólise, permanecendo a 100 °C por 3,5 h, conforme metodologia de Brandl et al. (1988). Os grupos de ésteres metílicos formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm) e detector de ionização de chama (FID). As temperaturas de operação foram até 250 °C para injetor e detector. O programa

utilizado para separar os ésteres metílicos foi: 60 °C por 2 min, taxa de incremento de 25 °C.min⁻¹ até atingir 180 °C por 8 min. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão de poli(ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

4.8.8 Quantificação de células secas

A concentração celular da bactéria *R. eutropha* foi determinada por gravimetria a partir de um volume conhecido do meio de cultura. O meio de cultura foi centrifugado em tubos Falcon, previamente tarados, a 8667 g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em água destilada e centrifugado por duas vezes para lavagem das células e retirada do meio de cultura. Após este procedimento, os tubos foram secos em estufa a 90 °C por 24 h e anotado a massa. O teor de massa seca é a relação entre a massa obtida após a secagem pelo volume inicial de meio de cultura adicionado.

4.8.9 Rendimento de fibra e de secagem da fibra obtida

O rendimento do processo de secagem foi determinado usando a massa do CF contra a massa da solução de fibra misturada. O rendimento de fibra de CF foi calculado com base na quantidade de fibra recuperada da matéria-prima aplicada. Ambos os rendimentos são mostrados nas Equações 5 e 6.

$$\text{Rendimento de secagem} = \frac{\text{Massa seca da dispersão de fibra obtida}}{\text{Massa total da dispersão de fibra obtida}} \quad (5)$$

$$\text{Rendimento CF} = \frac{\text{Massa seca do CF} \times \text{Conteúdo de Fibra (\%)}}{\text{Massa da matéria-prima aplicada}} \quad (6)$$

4.8.10 pH

Para medição do pH do meio de cultivo da alga *C. fusca* foi efetuada medição direta em pHmetro (MODELO AG, METLER TOLEDO, SCHWERZENBACH, SUIÇA).

Para medição do pH, as amostras foram pré-diluídas em água destilada à concentração de 1,5 % (m:v) e homogeneizada por 30 min com auxílio de agitador magnético (THERMO FISHER SCIENTIFIC). O pH foi determinado de acordo com a metodologia nº 943.02 da AOAC (2000a) utilizando-se de pHmetro previamente calibrado (ACCUMET AR15, FISHER SCIENTIFIC, USA).

4.8.11 Capacidade de retenção de água do CF

Para determinação da capacidade de retenção de água foi utilizada a metodologia descrita por Luo et al. (2017) com adaptações. Foi tomada a massa de 0,2 g do CF obtido em tubos de centrífuga previamente tarados (15 mL) e esta foi homogeneizada com 10 mL de água destilada em vórtex (ANALOG VORTEX, THERMO FISHER SCIENTIFIC) por 30 s e os tubos foram armazenados em temperatura ambiente por 24 h. Após este período, os tubos foram centrifugados (HARAEUS CENTRIFUGE, X1R, THERMO FISHER SCIENTIFIC) a 3000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi recolhido e os tubos foram acondicionados invertidos por 30 min. Após este período foram tomadas as massas dos tubos e a diferença entre a massa de amostra seca e a massa de amostra hidratada foi calculada. A capacidade de retenção de água foi expressa em gramas de água por grama de amostra seca (g.g^{-1} de amostra).

4.8.12 Capacidade de inchamento do CF

Para determinação da capacidade de inchamento do CF obtido, foi seguido o descrito por Luo et al. (2017) com pequenas adaptações. Foi tomada a massa de 0,2 g do CF obtido e colocadas em provetas graduadas de $10 \pm 0,1$ mL e o volume ocupado pela amostra foi medido. Na mesma proveta, foi adicionado 10 mL de água destilada e foi efetuada homogeneização em vórtex (ANALOG VORTEX, THERMO FISHER SCIENTIFIC) por 30 s. A proveta foi mantida a temperatura ambiente por 24 h. Após este período, foi mensurado o volume hidratado do CF e a capacidade de inchamento foi determinada como a diferença entre os volumes hidratado e seco por grama de amostra (mL.g^{-1} de amostra).

4.8.13 Capacidade de retenção de óleo do CF

A capacidade de retenção de óleo foi determinada, baseada no descrito por Luo et al (2017), com modificações. Em um tubo de centrífuga previamente tarado de 15 mL, foi tomada massa de 0,2 g do CF obtido e adicionado 5 mL de azeite de oliva, sendo o tubo agitado em vórtex (ANALOG VORTEX, THERMO FISHER SCIENTIFIC) por 30 s. Os tubos foram então mantidos a 37 °C por 1 h em banho aquecido de água (VWR INTERNATIONAL) e após este período, os tubos foram centrifugados (HARAEUS CENTRIFUGE, X1R, THERMO FISHER SCIENTIFIC) a uma velocidade de 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e os tubos foram acondicionados invertidos por 30 min. Após este período, foram medidas as massas dos tubos e a capacidade de retenção de óleo calculada e expressa em gramas de óleo por gramas de amostra (g.g amostra^{-1}).

4.8.14 Tamanho de partícula do CF

O CF obtido, foi disperso, em água destilada na proporção de 6 % (w:v) e agitado por 30 s com auxílio de agitador magnético (THERMO FISHER SCIENTIFIC). A distribuição de tamanho de partícula foi determinada por difração de laser utilizando analisador de tamanho de partícula (MALVERN MASTERSIZER 2000, MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, UK) equipado com unidade de dispersão de amostra Hydro 2000SM (MALVERN INSTRUMENTS) a 25 °C. O índice de refração considerado para o CF foi de 1,4701. O tamanho de partícula foi expresso como a média do diâmetro de superfície (D[3,2]) e a média do volume (D[4,3]).

4.8.15 Viscosidade aparente e reologia do CF

O CF obtido, foi disperso, em água destilada na proporção de 6 % (w:v) e agitado por 30 s com auxílio de agitador magnético (THERMO FISHER SCIENTIFIC). O comportamento reológico foi caracterizado em um reômetro oscilatório (ANTON-PAAR PHYSICA MCR301, ANTON-PAAR, AUSTRIA) acoplado a banho termostático de água (JULABO, GERMANY) à temperatura de 20 °C utilizando *probe* de placas paralelas PP50 (Placas paralelas; com diâmetro de placa 49,65 mm) com altura de 1,0 mm. Cada amostra foi submetida a três contínuas rampas de taxa de cisalhamento (subida, descida e subida novamente), variando de 0 a 400 s⁻¹ por 2 min em cada curva (DE SOUZA et al., 2018; FERREIRA et al., 2018). O modelo da Lei de Potência foi ajustado para o resultado experimental da segunda rampa de subida como demonstrado na Equação 7.

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (7)$$

onde σ é a tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹), K é o índice de consistência (Pa.sⁿ) e n é o índice de comportamento de fluxo (sem dimensão).

4.8.16 Microscopia de luz

As amostras do CF foram observadas usando um microscópio de luz (MODELO BX60, OLYMPUS OPTICAL CO., LTD., TÓQUIO, JAPÃO). As imagens foram capturadas por sistema computadorizado de análise de imagens (IMAGE-PRO PLUS, VERSÃO 6.0, MEDIA SILVERNET, INC., SILVER SPRING, MD) e salvas como arquivos TIF.

4.8.17 Perda de cozimento na emulsão modelo

As emulsões modelo foram testadas quanto a sua perda de cozimento de acordo com o protocolo descrito por Álvarez & Barbut (2013), com pequenas modificações. Três

amostras de 30 ± 1 g da emulsão crua foi embutido em tubos de centrifuga de 50 mL previamente tarados. Os tubos foram centrifugados (HARAEUS CENTRIFUGE, X1R, THERMO FISHER SCIENTIFIC) a 3000 rpm por 1 min para remover possíveis bolhas de ar da massa. Os tubos então foram cozidos em banho termostático de água (VWR INTERNATIONAL) seguindo o mesmo procedimento de cozimento das emulsões previamente descritos (de 50 a 72 °C em aproximadamente 40 min). Os tubos então foram resfriados em banho de água e gelo por 5 min e acondicionados invertidos por 14 h para liberação do líquido exsudado. Após este período, foram medidas as massas dos tubos e os resultados foram expressos como a razão entre a massa final e a massa crua da emulsão.

4.8.18 Análise do perfil de textura das emulsões (APT) na emulsão modelo

As propriedades de textura das emulsões cozidas foram avaliadas por testes de compressão utilizando um analisador de textura (TA.XT2; TEXTURE TECHNOLOGIES CORP., SCARSDALE, NY, USA) seguindo a metodologia descrita por Álvarez & Barbut (2013). Anteriormente à análise, as emulsões foram cortadas em peças cilíndricas de 10 mm de altura e subsequentemente foram comprimidas duas vezes a 75 % de sua altura original utilizando um *probe* de alumínio cilíndrico à velocidade de $1,5 \text{ mm.s}^{-1}$. As medições foram obtidas no dia seguinte ao preparo das emulsões modelo. Para cada réplica foram tomadas 5 amostras e os parâmetros avaliados foram dureza (N), adesividade (g.sec^{-1}), coesividade, elasticidade (mm), gomosidade (N) e mastigabilidade (N.mm).

4.8.19 Cor da emulsão modelo

A cor das emulsões foi mensurada, fazendo uma leitura direta das amostras, usando colorímetro Chroma Meter CR-400 com ângulo de visão de 10° e iluminador D65 (KONICA MINOLTA, OSAKA JAPAN). Os parâmetros CIE-L*, a*, b* foram avaliados de acordo com a metodologia proposta pela American Meat Science Association (AMSA, 2012). A média de cinco leituras de medição de cor para cada amostra foi relatada.

4.8.20 Estabilidade da emulsão modelo

Os parâmetros de estabilidade da emulsão foram avaliados conforme descrito por Tahmasebi et al. (2016) com algumas modificações. Primeiro, aproximadamente 15 g de cada formulação de massa de carne foram pesados em tubos de centrífuga previamente pesados. Os tubos foram centrifugados a 2500 g por 5 min e posteriormente colocados em banho-maria com água à 50 °C até que a temperatura interna da emulsão atingisse 50 °C. Na sequência, a

temperatura da água foi elevada para 80 °C e os tubos foram mantidos até atingir 72 °C internamente. Os tubos foram resfriados em água fria e deixados em repouso invertidos durante 45 min para liberar os exsudados em pratos de alumínio previamente pesados. A quantidade total de fluido liberado foi expressa como porcentagem do peso da amostra. O teor de gordura liberada foi determinado pela diferença no líquido total liberado antes e após a secagem em estufa a 100 °C por 16 h. A água liberada pela evaporação também foi expressa como a porcentagem do peso da amostra.

4.8.21 Análise estatística

A análise dos resultados obtidos, bem como o DCCR, foi realizada em software Statistica 5.0 (Statsoft, EUA). A significância da equação do modelo de segunda ordem foi determinada usando o teste F de Fisher. A análise estatística do modelo foi realizada como análise de variância (ANOVA). A variância explicada pelo modelo foi dada pela determinação múltipla de coeficientes (R^2). Para cada variável, os modelos quadráticos foram representados como gráficos de contorno (2D). Também foi utilizada a comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

Para análise estatística do CF obtido, os dois tratamentos testados (40 e 50 mg. mL de tampão⁻¹) foram testados em cada parâmetro comparado pelo t-test com 95 % de significância utilizando software Statistica (StatSoft). A Lei da Potência foi ajustada para os dados experimentais das curvas de fluxo utilizando software SAS (SAS University Edition, Cary, USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média desvio padrão.

Os experimentos de emulsão foram testados em triplicata em três amostras distintas e independentes ($n = 15$ amostras). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando software SAS (SAS Inst. Inc., Cary, USA). A homogeneidade das variâncias foi testada com os testes de Levene e Brown-Forsythe no caso de dados não normais com o PROC GLM do SAS. A normalidade dos resíduos foi testada usando o PROC UNIVARIATE do SAS, e foi considerado o teste de Shapiro-Wilks para a normalidade e um gráfico de probabilidade normal. Uma vez determinado que as suposições da ANOVA foram atendidas para esses dados, o procedimento GLIMMIX do SAS com efeito fixo de tratamento e efeito aleatório de replicação foi utilizado para a determinação estatística de todas as variáveis. As médias dos mínimos quadrados foram separadas usando a opção PDIFF com um ajuste de Tukey-Kramer. Os resultados foram consideradas estatisticamente diferentes em $P < 0,05$.

Na avaliação dos cultivos da microalga *C. fusca*, as diferenças entre os valores médios obtidos em cada ensaio foram avaliadas por meio de análise de variância, seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 95 % ($p > 0,05$), utilizando software Statistica (StatSoft).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 HIDRÓLISE PARA OBTENÇÃO DE SACARÍDEOS

5.1.1 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química do envoltório de celulose (EC), do envoltório de celulose residual (ECR) e do envoltório de celulose lavado (ECRL), em base seca, é apresentada na Tabela 7. Para o EC, o teor de proteína não foi detectável e o valor de lipídeos foi de $8,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e o das cinzas foi de $0,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, enquanto os carboidratos, por diferença, foram calculados em $91 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. O valor dos lipídios nesta amostra é identificado pelo produtor como óleos adicionados para facilitar o descascamento dos filmes de revestimento de celulose no processo de produção de embutidos (CUMBA, 2005; MAROUŠEK et al., 2015). Para o ECR, os valores apresentados na Tabela 7 confirmaram as observações de Gentry et al. (1996), onde os envoltórios de celulose residuais continham principalmente celulose e líquidos derivados do cozimento de salsichas, incluindo proteínas, gorduras e sais como nitrito e nitrato. Os mesmos autores encontraram valores para EC de $2,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para proteína e $2,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para gordura, enquanto Sreenath e Jeffries (2011) encontraram $95,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para carboidratos totais.

Tabela 7 – Composição química proximal apresentada pelos diferentes envoltórios celulósicos.

Componente ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)*	EC	ECR	ECRL
Proteína	$0,0 \pm 0,00$	$1,9 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,00$
Lipídios	$8,8 \pm 0,20$	$13,3 \pm 0,98$	$1,0 \pm 0,23$
Cinzas	$0,2 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,12$
Carboidratos**	$91,0^{**}$	$82,8^{**}$	$97,6^{**}$

* Base seca ** obtido por diferença. EC = Envoltório Celulose;

ECR = Envoltório Celulose Residual; ECRL = Envoltório Celulose Residual Lavado.

Após o processamento das salsichas, o ECR contém mais umidade do que o novo invólucro, apresentando valores de $53 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ contra $14 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ do EC. A matéria seca insolúvel no ECR consiste em envoltório celulósico e pequenas frações de carne do processo. A análise de carboidratos pelo protocolo da NREL/TP-510-42618 apontou resultados de açúcares em $88,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em base úmida, confirmando os dados da composição determinada da Tabela 7, quando calculado em base seca o montante alcança $96 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. As listras de tinta preta presentes no envoltório representam cerca de 8 % da área da superfície do envoltório (CUMBA, 2005). Neste trabalho, os envoltórios utilizados não continham nenhuma pigmentação de superfície.

A lavagem do ECR foi eficaz para a remoção de alguns componentes que podem influenciar no processo de hidrólise enzimática, como lipídios e cinzas. O teor de proteína reduziu de 1,9 para 1,0 g.100 g⁻¹, teor de lipídios de 13,3 para 1,0 g.100 g⁻¹ e teor de cinzas de 2,0 para 0,4 g.100 g⁻¹. Isso aumentou o teor de carboidratos de 82,8 para 97,6 g.100 g⁻¹ (base seca). Esses dados confirmam o potencial do ECRL de ser utilizado como fonte de açúcar em bioprocessos e destaca o objetivo deste trabalho de aplicar a hidrólise enzimática nos envoltórios de celulose para liberação desses açúcares.

5.1.2 Atividade enzimática

O ensaio de atividade total enzimática da celulase é comumente realizado utilizando o papel de filtro Whatman No. 1. como substrato, sendo chamado de ensaio em papel de filtro, que foi estabelecido e publicado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (YU et al., 2016; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Quando o filtro de papel foi utilizado como substrato, a atividade enzimática do complexo Celluclast® foi de 75 U.mL⁻¹ e para Viscozyme® o valor obtido foi de 10 U.mL⁻¹. No entanto, quando o ECRL foi utilizado como substrato, a atividade enzimática foi de 37 U.mL⁻¹ para o complexo Celluclast® e 3 U.mL⁻¹ para Viscozyme®

Em ambos os casos, utilizou-se a mesma massa de substrato e a reação foi realizada nas mesmas condições. O ECRL é um filme obtido a partir do processo de regeneração da celulose I, derivado de pasta de madeira de alta qualidade (RUST; KNIPE, 2014) e com estrutura altamente coesiva por conta das suas ligações de hidrogênio, conferindo excepcional resistência aos envoltórios de celulose e tornando-a insolúvel em água, apesar de sua hidrofiliabilidade (BARBUT, 2011; SAVIC; SAVIC, 2016); estas características possivelmente diminuem a capacidade da enzima de ser adsorvida e hidrolisar o substrato, justificando o menor valor de atividade enzimática contra o substrato PF.

Celluclast® e Viscozyme® são misturas de endo e exo-glucoanases e β-glicosidase. Bansal et al. (2009) descreveram que os preparados enzimáticos de celulases são uma mistura de componentes como celobiohidrolases e endoglucoanases, onde o complexo enzimático tem maior atividade que os componentes individuais, isoladamente. Foi descrito que a heterogeneidade da celulose insolúvel e a complexidade da mistura de enzimas que compõem a mistura de celulase podem causar problemas na medição da atividade total da celulase (YU et al., 2016); conseqüentemente, isso explica porquê as atividades enzimáticas do ECRL serem menores que as atividades obtidas quando filtro de papel foi usado como substrato. A atividade enzimática não depende apenas das variáveis enzimáticas (pH, temperatura, agitação, substrato

e concentração da enzima), mas também das características do substrato, como grau de polimerização, cristalinidade ou tamanho dos poros (BOMMARIUS et al., 2008), características que também poderiam influenciar na diminuição da atividade do preparado de ambas as enzimas, quando o ECRL é usado como substrato

5.1.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Os resultados obtidos no DCCR são mostrados na Tabela 8. O maior valor de ART foi obtido no ensaio 8, apresentando valores de $46,73 \text{ mg.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de proteína do preparado enzimático, utilizando concentração de enzima de 1:200 (v:v) e $34,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de substrato em tampão. Os valores de temperatura e pH foram escolhidos a partir de indicações do fornecedor da enzima, correlacionados com atividade enzimática e que estão de acordo com a literatura (ANNAMALAI; SIVAKUMAR; OLESKOWICZ-POPIEL, 2018; RODRIGUES et al., 2015; SILVEIRA et al., 2014; ZAIN et al., 2018).

Tabela 8 – Resultado experimental do delineamento composto central rotacional para complexo enzimático Celluclast® e envoltório celulósico residual como substrato.

Experimento	X1	X2	Y1
1	-1 (1:300)	-1 (10)	9,95
2	1 (1:100)	-1 (10)	6,60
3	-1 (1:300)	1 (30)	33,33
4	1 (1:100)	1 (30)	15,37
5	-1,41 (1:341)	0 (20)	34,21
6	1,41 (1:59)	0 (20)	11,45
7	0 (1:200)	-1,41 (5,9)	7,44
8	0 (1:200)	1,41 (34,1)	46,73
9	0 (1:200)	0 (20)	18,61
10	0 (1:200)	0 (20)	18,33
11	0 (1:200)	0 (20)	19,17

X1 = Preparado enzimático (v:v); X2 = substrato (mg.mL^{-1} tampão)

Y1 = $\text{mg.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de ART por proteína do preparado enzimático

A Tabela 9 apresenta a análise estatística do DCCR, mostrando os resultados das variáveis significativas nesses experimentos. Na alta concentração de substrato foram liberadas maiores quantidades de açúcares redutores, confirmados pelo efeito linear positivo, sendo o maior efeito na reação. Jørgensen et al. (2007) e Kristensen, Felby e Jørgensen (2009) em seus estudos com alta carga de substratos também obtiveram o mesmo efeito, obtendo melhor formação de produto em altas concentrações de substrato.

Tabela 9 – Regressão para hidrólise enzimática de envoltórios de celulose residual.

Variável	Coefficiente Regressão	Erro Padrão	P-Valor
Média	18,62*	0,18	< 0,005
X1L	-6,70*	0,15	< 0,005
X2L	10,97*	0,15	< 0,005
X2Q	2,05*	0,17	< 0,005
X1.X2	-3,65*	0,21	< 0,005

X1L = enzima linear; X2L = substrato linear; X2Q = substrato quadrático;
X1.X2 = interação enzima:substrato.

* Estatisticamente significante a um nível de confiança de 95 %.

A concentração de enzima apresentou efeitos lineares e de interação negativos.

Observando a liberação do ART, utilizando a maior concentração de enzima no maior substrato, os resultados são semelhantes aos da corrida no ponto central, apresentando valores de 15 a 19,2 mg.mL⁻¹.g⁻¹ de ART por proteína do preparado enzimático, respectivamente. Porém, quando maior quantidade de enzima foi utilizada na concentração central de substrato, o resultado obtido no ponto central (ponto axial), em ART por g de proteína da enzima, foi 3 vezes maior, apresentando valores de 11,5 e 46,7 mg de ART por g de proteína da preparação enzimática. A Equação 6 apresenta o modelo testado para o CCD nas condições estudadas. A Figura 10 mostra a superfície de contorno obtida para os experimentos de DCCR. O gráfico de dados previsto versus experimental e o gráfico normal de resíduos são apresentados nas Figuras 11 e 12 respectivamente.

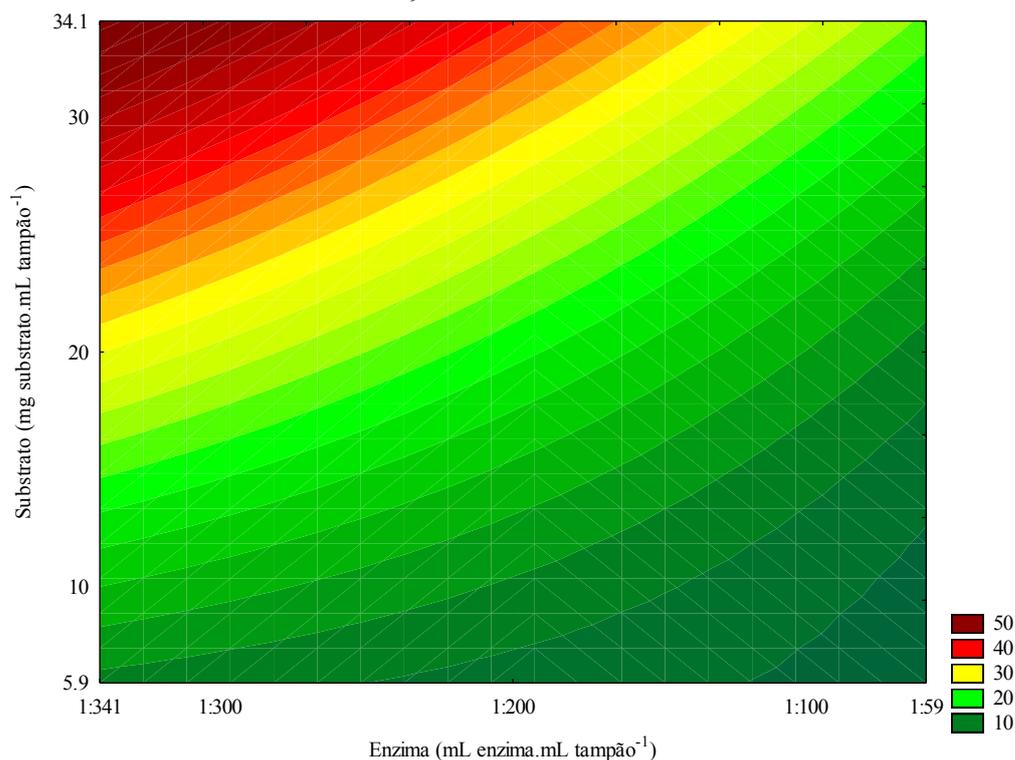
Figura 10 – Superfície de contorno da conversão do envoltório celulósico residual em açúcares redutores.

Figura 11 – Gráfico de probabilidade normal para resíduos brutos do delineamento composto central rotacional. Y = ART (mg.mL^{-1}); X1 = concentração de enzima; X2 = concentração de substrato. R^2 = coeficiente de determinação.

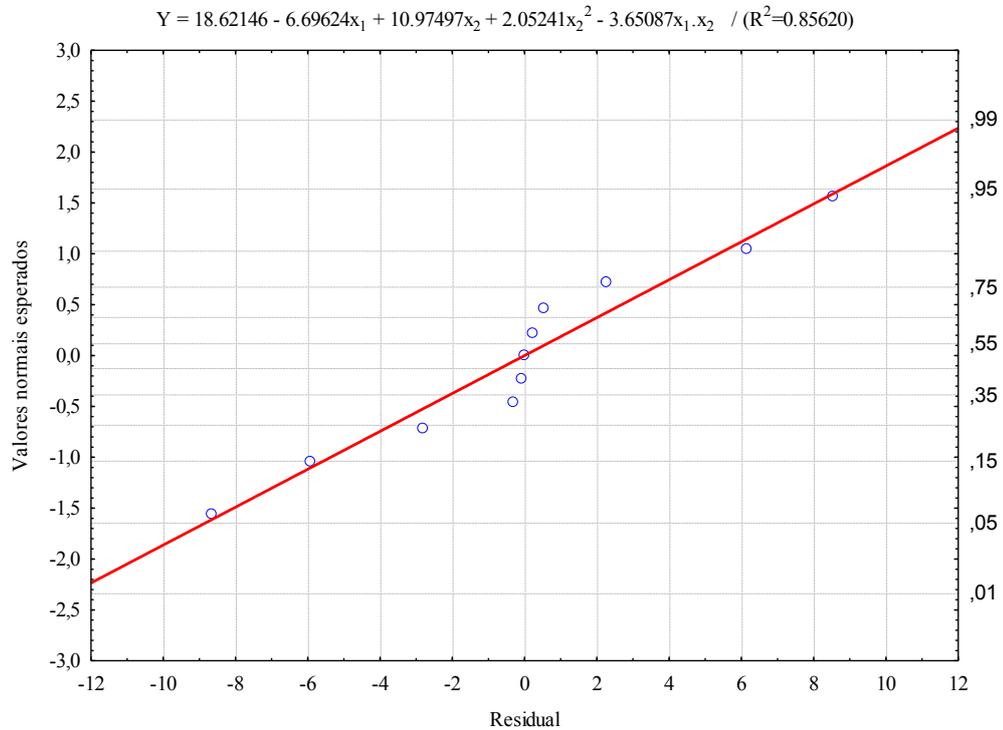
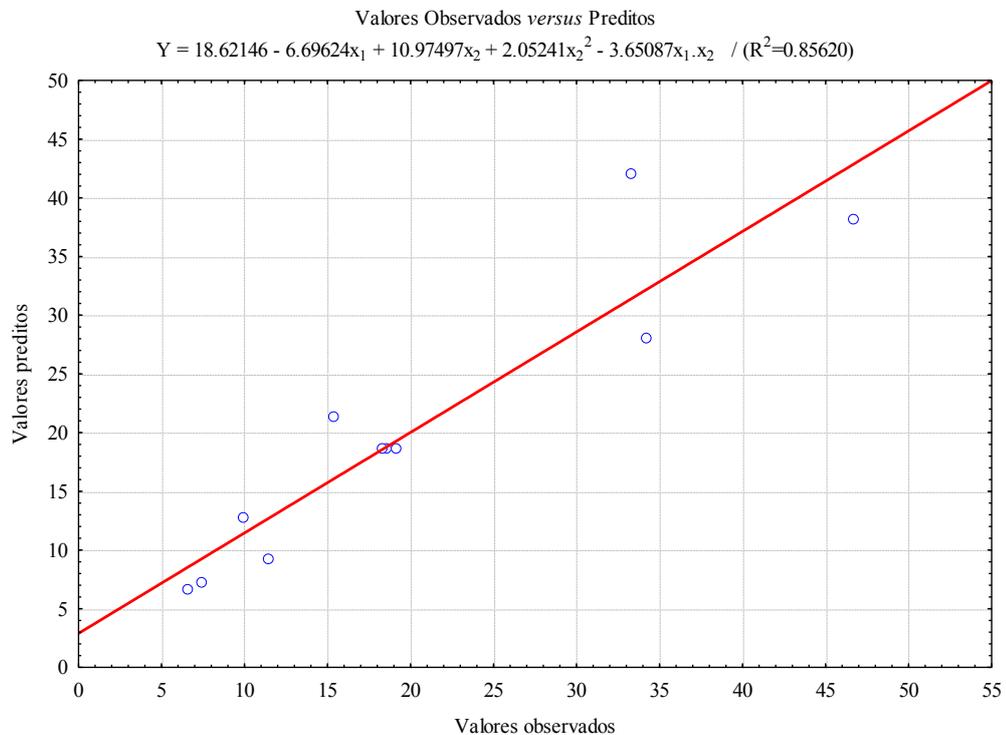


Figura 12 – Comparação teórica e experimental para os valores de açúcares redutores totais do delineamento composto central rotacional. Y = ART (mg.mL^{-1}); X1 = concentração de enzima; X2 = concentração de substrato. R^2 = coeficiente de determinação.



$$Y = 18,62146 - 6,69624X_1 + 10,97497X_2 + 2,05241X_2^2 - 3,65087X_1.X_2$$

(6)

O teste estatístico de Fisher para análise de variância (ANOVA) apresentou valores de F de 8,93 ($p < 0,05$) para a regressão, demonstrando significância estatística para o modelo proposto. Este então foi verificado pelo coeficiente de correlação (R) e o valor foi de 0,93, demonstrando uma representação satisfatória do modelo de processo e uma boa correlação entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pela equação do modelo (Eq. 6). A condição da experiência 8 foi escolhida para a sequência deste estudo e os ensaios cinéticos para avaliação da ART total, e para determinação da quantidade de glicose e celobiose por CLAE.

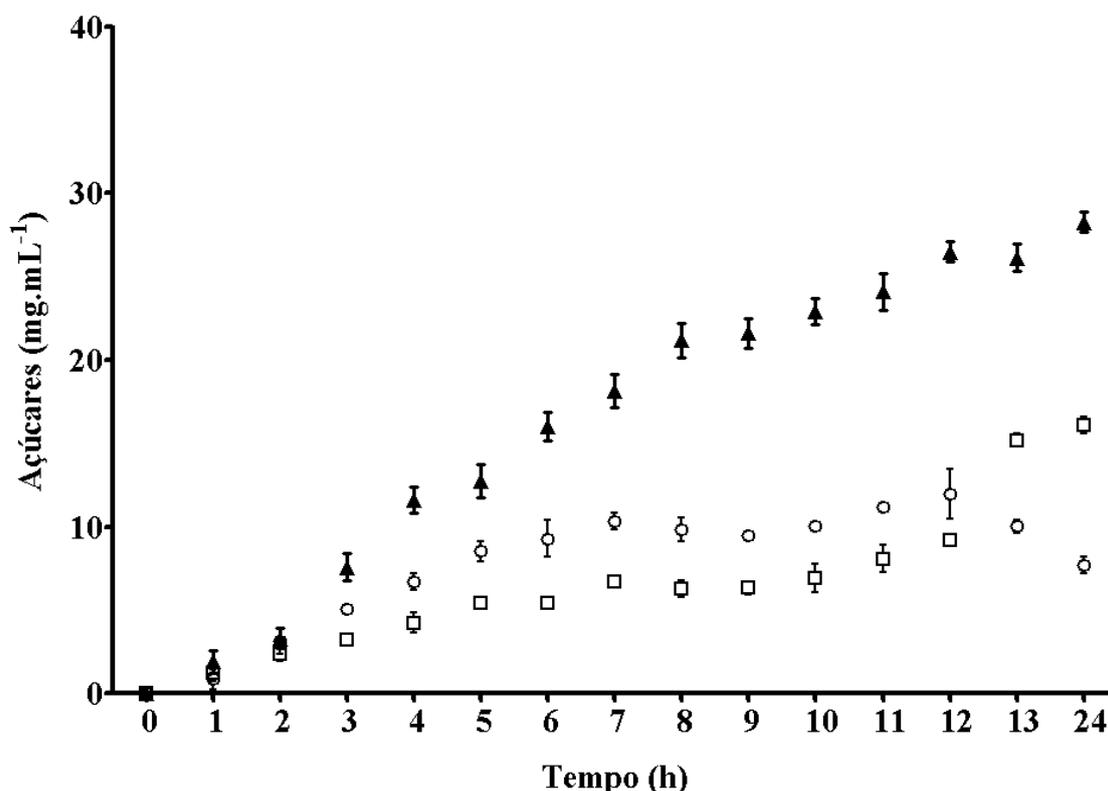
5.1.4 Cinética da reação de hidrólise enzimática

Os experimentos de DCCR foram realizados com tempo de reação de 1 h para avaliar a variação da enzima e influência do substrato no processo. Após a obtenção das melhores condições no DCCR, foram realizados experimentos de cinética para definir o comportamento enzimático, obtendo-se a máxima hidrólise do substrato no processo. O estudo foi realizado em reator de vidro de 500 mL com 250 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol.L^{-1}), aumentando o DCCR em 1,25x e mantendo as condições enzimáticas/substrato determinadas no DCCR, com pH 4,8, temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e velocidade de rotação de 175 rpm. As concentrações de substrato e enzima otimizadas no DCCR foram $34,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de substrato e 1:200 (v:v) para a enzima. O comportamento do ART liberado pelo complexo enzimático Celluclast® utilizando como substrato o ECRL é apresentado na Figura 13.

A concentração de ART aumentou até as 12 h de reação e permaneceu constante após esse período. A quantificação de mono e dissacarídeos (glicose e celobiose) por CLAE mostrou que, antes das 6 h, a taxa de formação de celobiose foi maior que a glicose, provavelmente porque a atividade de exo e endo-glucanases foram maiores que da β -glicosidase, devido à maior disponibilidade de substrato e sua baixa solubilidade. De 6 a 12 h, a taxa de formação de glicose e celobiose foi semelhante, indicando que não há reação limitante durante esse período. No entanto, após 12 h, a concentração total de açúcar redutor atingiu o seu máximo, e a taxa de formação de glicose foi maior do que a celobiose, com a concentração do dissacarídeo reduzida devido à atividade da β -glicosidase. Após 25 h, quando o processo foi interrompido, o rendimento de ART por substrato foi de cerca de 85 % (m:m), contendo cerca de 15 mg.mL^{-1} de glicose e 8 mg.mL^{-1} de celobiose, demonstrando que o processo enzimático foi eficaz para converter o ECRL em mono e dissacarídeos, usando o complexo enzimático Celluclast® nas condições aplicadas. No ponto final, uma análise por CLAE-MS-MS foi

realizada para verificar se havia outros carboidratos além de glicose e de celobiose. O resultado não apresentou nenhum tipo de molécula, seja glicose ou celobiose na amostra.

Figura 13 – Cinética da reação de hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado pela Celluclast®. Condições de reação: 34,1 mg.mL⁻¹ de substrato, 1:200 mL.mL⁻¹ de enzima, pH 4,8 e 50 °C. (▲) ART; (□) Glicose e (○) Celobiose.



No início da hidrólise, a taxa de formação de glicose e celobiose é menor, possivelmente devido à insolubilidade do material celulósico no tampão e à adaptação da enzima ao ambiente da reação (tempo, temperatura, agitação, etc.). Para hidrolisar eficientemente os substratos celulósicos, as celulasas devem primeiro poder acessar as cadeias de celulose que são compactadas sob a forma de microfibras insolúveis (ARANTES; SADDLER, 2010). As celulasas reagem com substratos insolúveis; existem três processos que ocorrem simultaneamente: 1) modificação química e física na celulose em fase sólida ainda não solubilizada; 2) hidrólise primária com os materiais celulósicos solúveis e intermediários libertados, originários das cadeias; e 3) hidrólise secundária com os materiais celulósicos solúveis para um peso molecular mais baixo até se formarem monômeros de glicose. Os próximos passos são as endo e exo-glucanases atuantes nas cadeias, diminuindo o grau de polimerização (DP), tornando as cadeias solúveis e mais acessíveis ao processo enzimático (ZHANG; LYND, 2004).

O processo de hidrólise do ECRL por celulases comerciais é totalmente dependente de algumas propriedades estruturais tais como o DP, a cristalinidade, a distribuição do tamanho dos poros, o tamanho de partícula e a área de superfície disponível e além dessas propriedades são fatores relacionados à enzima como inativação térmica (tempo x temperatura do processo), inibição por acúmulo de produto (celobiose e glicose), inativação por quebra da molécula da enzima e perda por adsorção, tornando ineficaz as enzimas no complexo carboidrato (BOMMARIUS et al., 2008; SILVEIRA et al., 2014).

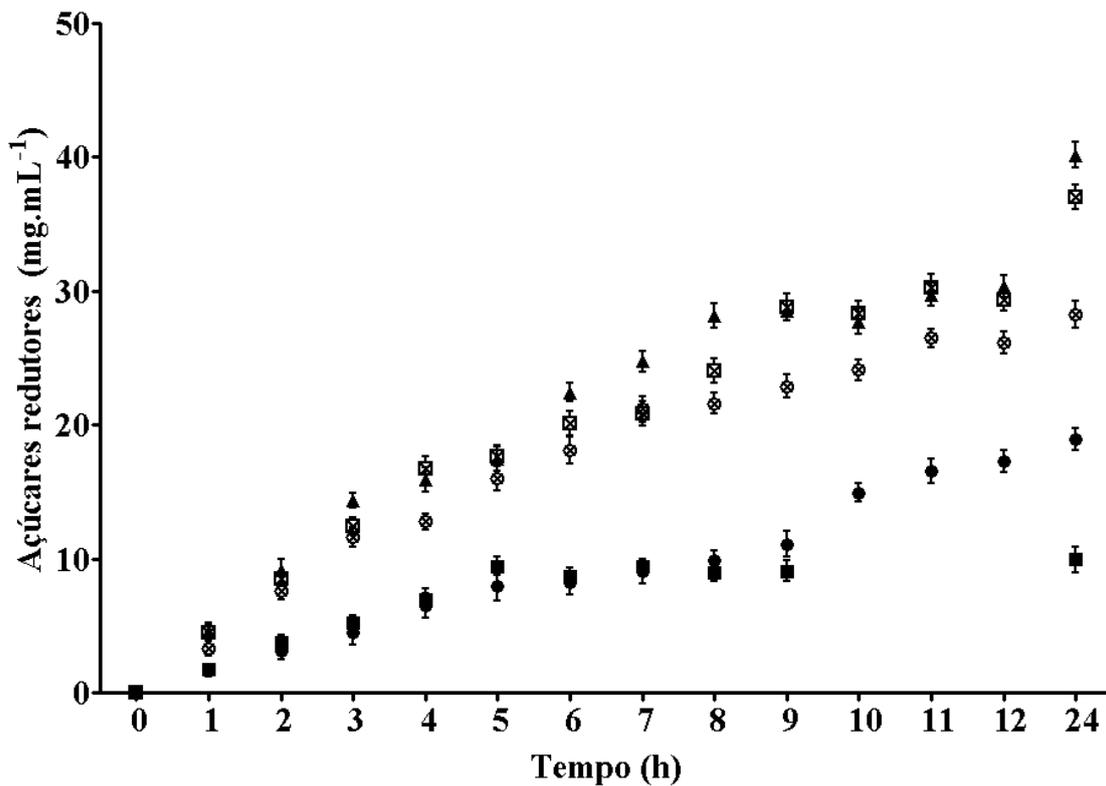
Para celulose nativa, hemicelulose e lignocelulose, o conteúdo de polissacarídico se localiza no conteúdo cristalino. Para acessar esses polissacarídeos é necessário aplicar tratamentos (físico ou termoquímico) para quebrar as ligações de cristalinidade dos materiais facilitando o processo enzimático ou aqueles utilizados pelos microrganismos (JAIN; WEI; TIETJE, 2016; MOHAPATRA et al., 2017). Os envoltórios de celulose residuais são celulose de matéria-prima que passa por um processo de regeneração com solubilização alcalina e transformada em xantatos por adição de dissulfeto de carbono. Além disso, o xantato é novamente solubilizado em álcali e depois precipitado com ácido sulfúrico e sulfato de sódio durante a fiação para produzir os filmes (GENTRY et al., 1996). Este processo quebra a cristalinidade e o tamanho aparente do cristal da celulose (DE DAMBORENEA et al., 2007), e facilita a hidrólise enzimática pelas celulases.

A superfície de resposta do DCCR apresentou que, no nível mais alto de concentração de substrato ($34,1 \text{ mg.mL}^{-1}$), maior quantidade de ART é liberadas no processo. A fim de verificar se o aumento do substrato melhoraria a conversão de açúcar, foram feitos experimentos de reação de tempo de percurso incrementando a concentração do substrato. A Figura 14 apresenta o processo de hidrólise com as mesmas condições (pH 4,8, temperatura 50°C , agitação 175 rpm e enzima 1: 200 (v: v)) e com variação da concentração de substrato no processo em % (m:v), apresentando o mesmo padrão em todas as reações, aumentando a ART durante o tempo de hidrólise. Nas reações com 40 e 50 mg.mL^{-1} , ao final do processo foi observada a presença de partículas insolúveis, representando que a reação enzimática não solubilizou ou hidrolizou a totalidade de substrato. Isso possivelmente ocorreu porque o sinergismo das celulases foi afetado pela inibição da β -glicosidase. Essa inibição poderia causar o acúmulo de celobiose e, conseqüentemente, a diminuição da atividade sobre as exoglucanases e as endoglucanases. O rendimento de conversão foi de 70 a 75 %, abaixo do máximo obtido no DCCR, que foi de 85 % de conversão (m:m).

Alguns autores descreveram a inibição da enzima Celluclast® pelo aumento da formação de produto (glicose e celobiose). Philippidis, Smith e Wyman (1993) apresentaram

valores de K_I de glicose para as celulases como 53 g.L^{-1} , descrevendo uma inibição fraca e para as β -glicosidasas de $0,62 \text{ g.L}^{-1}$, descrevendo uma inibição muito forte, e também apresentam valores de K_i de celobiose para as celulases de $5,85 \text{ g.L}^{-1}$ descrevendo uma forte inibição. Oh et al. (2000) demonstraram os resultados da inibição para as celulases e as β -glicosidasas sendo de $12,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. Andrić et al. (2010) estudaram a adição de glicose ($0-40 \text{ g.L}^{-1}$) na hidrólise da palha de trigo por celulases comerciais. Apresentaram valores modelados para K_I de $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ para o modelo competitivo e $1,15 \text{ g.L}^{-1}$ para um modelo não competitivo de inibição das misturas de celulase.

Figura 14 – Cinética da reação de hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado pela Celluclast® com diferentes concentrações de substrato. Condições de reação: 10; 20; 34,1; 40 e 50 mg.mL^{-1} de substrato, 1:200 mL.mL^{-1} de enzima, pH 4,8 e 50 °C. (■) 10; (●) 20; (⊕) 34,1; (⊕) 40 e (▲) 50



A conversão enzimática diminui linearmente com o aumento de sólidos na reação (razão enzima / substrato) (JØRGENSEN et al., 2007), e esse fenômeno tem sido referido como “o efeito do sólido” (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009). Os mesmos autores referem que vários estudos sugerem que o mecanismo por trás dessa perda de rendimento é a inibição pela formação do produto ou inibição por outros compostos como inibidores derivados do açúcar (furfural e hidroximetilfurfural). Outro estudo sugeriu que isso poderia ser explicado

por limitações de transferência de massa relacionadas ao aumento do teor de sólidos insolúveis, diminuindo a adsorção não produtiva das enzimas. Além disso, a diminuição do rendimento confirmou que a natureza fibrosa do substrato causa um efeito negativo na hidrólise porque impede a transferência de massa em cargas de substrato mais elevadas (KUBICEK; KUBICEK, 2016).

O ponto final de cada reação foi analisado por CLAE-RID e os resultados são apresentados na Tabela 10. À medida que a concentração do substrato aumenta, a quantidade de celobiose aumenta de zero, usando 10 mg.mL⁻¹ de substrato para 14mg.mL⁻¹ na reação com 50 mg.mL⁻¹ de substrato. A razão em % de glicose, em relação ao ART, diminuiu em todas as amostras, passando de 83 para 51 % e o conteúdo de celobiose aumentou de zero para 35 %.

Tabela 10 – Quantificação de açúcares redutores totais (ART), glicose e celobiose na reação de tempo de percurso com diferentes concentrações de substrato.

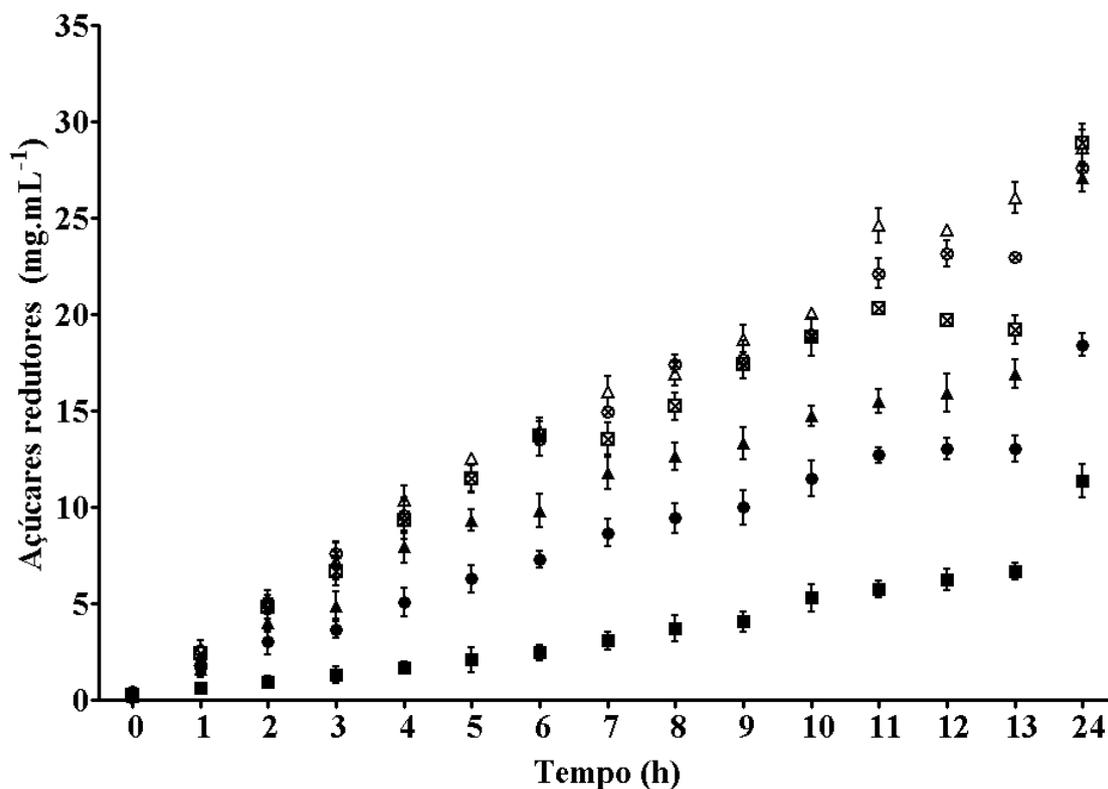
Substrato (mg.mL ⁻¹)	Componentes (mg.mL ⁻¹)		
	ART	Glicose	Celobiose
10	9,93	8,24	0,00
20	18,94	10,75	5,52
34,1	28,26	16,07	7,68
40	37,00	17,88	11,48
50	40,00	20,73	14,10

Isto pode ser explicado porque a β -glicosidase é incapaz de hidrolisar a uma taxa suficiente a celobiose a monômeros de glicose quando as concentrações de substrato são aumentadas de 10 a 50 mg.mL⁻¹. Na reação com a 10 mg.mL⁻¹ de substrato, toda a celobiose foi convertida em glicose. Como já explicado, isso pode ser devido à inibição das celulasas pela formação de glicose e celobiose e a inibição das β -glicosidasas pela liberação de glicose.

5.1.5 Adição de uma segunda enzima na hidrólise

Para melhorar a conversão da celulose em glucose, testou-se a utilização de uma segunda preparação enzimática em adição ou em substituição ao preparado enzimático Celluclast®. A Figura 15 apresenta a reação de tempo de percurso da hidrólise efetuando-se a substituição de Celluclast® por Viscozyme® (de 0 a 100 %) e a adição (100 % de Celluclast® + 25 % Viscozyme®). Quando substituiu-se parcial ou totalmente o Celluclast® por Viscozyme®, os resultados mostraram que o Viscozyme® apresentou menor atividade enzimática. Portanto, esta substituição resultou em menor quantidade de U adicionado na reação, resultando em menor conversão e liberação de mono e dissacarídeos, diminuindo o rendimento do processo e apresentando sólidos ao final da reação (substrato não hidrolisado).

Figura 15 – Cinética da reação de hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado com Celluclast® e Viscozyme®. Condições de reação: substrato 34,1 mg.mL⁻¹, enzima 1:200 mL.mL⁻¹, pH 4,8 e 50 °C. (■) Viscozyme® 100 %; (●) Viscozyme® 75 % + Celluclast® 25 %; (▲) Viscozyme® 50 % + Celluclast® 50 %; (⊕) Viscozyme® 25 % + Celluclast® 75 %; (⊕) Celluclast® 100 %; (△) Celluclast® 100 % + Viscozyme® 25 %.



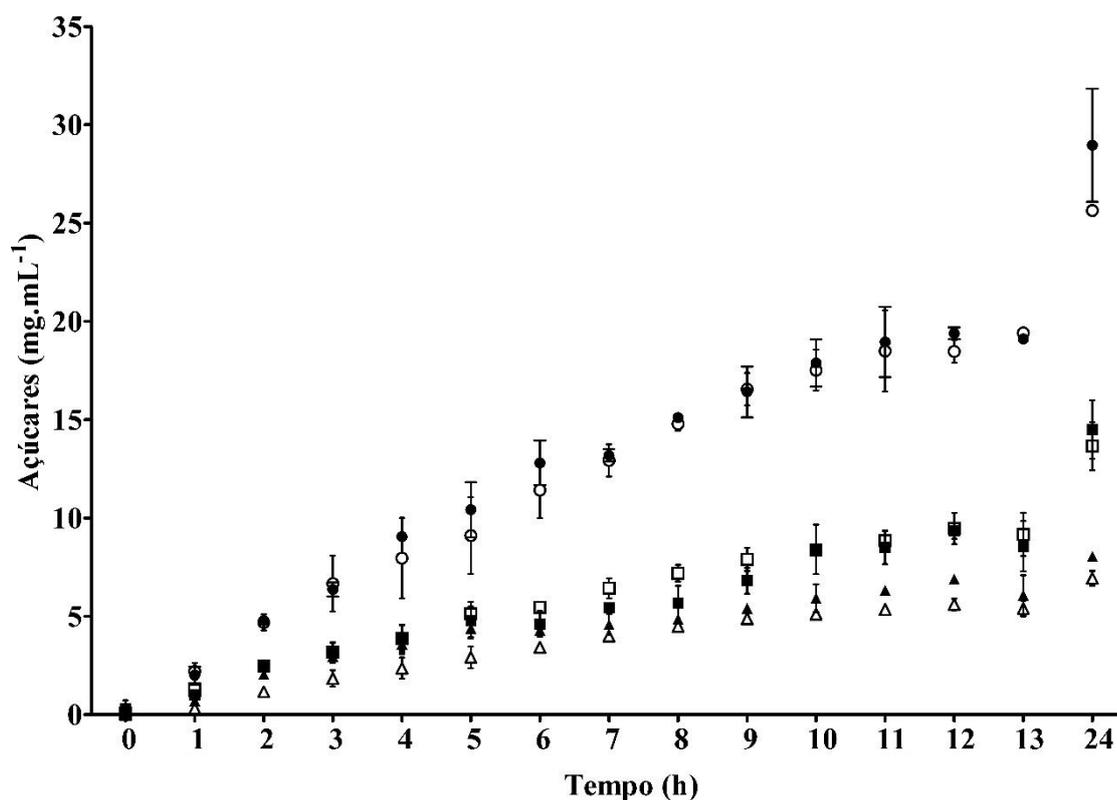
Além disso, nos experimentos que utilizaram 75 % de Celluclast® e 25 % de Viscozyme® ou 100 % de Celluclast® e 25 % de Viscozyme®, foram obtidos os melhores valores de conversão enzimática do ECRL em ART, atingindo 31 mg.mL⁻¹ (quantificado pela CLAE), sendo cerca de 70 % de glicose (71 e 74 %, respectivamente), obtendo-se melhores valores de conversão de celulose em glicose, quando comparado ao uso total de Celluclast®. No entanto, a adição de 25 % de Viscozyme® a 100 % Celluclast® não melhorou suficientemente a conversão final da celobiose em glicose para justificar a adição de custo no processo (20 mg.mL⁻¹ de glicose usando 75 % de Celluclast® e 25 % de Viscozyme® em comparação com 21 mg.mL⁻¹ no experimento com Viscozyme® adicional).

Com os resultados, a melhor conversão foi utilizando 34,1 mg.mL⁻¹, 1:200 (v:v) de enzima, sendo que desta concentração foram utilizados 75 % do seu volume do complexo enzimático Celluclast® e 25 % do complexo enzimático Viscozyme®, gerando um rendimento de conversão de 85 % e obtendo-se 20 mg.mL⁻¹ de glicose e 10 mg.mL⁻¹ de celobiose no produto final.

5.1.6 Aumento de escala da reação enzimática

Foi realizado um aumento de escala do processo enzimático e os resultados obtidos são apresentados na Figura 16. Todas as curvas apresentaram o mesmo comportamento, tanto para o reator de pequena escala (PQ) contendo 0,25 L de reação, quanto para o reator de grande escala (GD) contendo 4 L de reação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o ART, e os teores de glicose e celobiose para cada tipo de reator estudado nos pontos, sendo estes testados por Tukey ($p \geq 0,05$). O aumento de escala do processo foi obtido com sucesso para as condições estudadas.

Figura 16 – Cinética da reação para o aumento de escala da hidrólise enzimática do envoltório celulósico residual lavado. Comparação entre reator pequeno (PQ) e reator grande (GD). Condições de reação: substrato $34,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ tampão $^{-1}$, enzima $1:200 \text{ mL.mL}^{-1}$, pH 4,8 e $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. (●) ART-PQ; (○) ART-GD; (■) Glicose-PQ; (□) Glicose-GD; (▲) Celobiose-PQ; (△) Celobiose-GD.



Ao mesmo tempo em que a busca por novos produtos e processos apresenta desafios de mercado, como a diferenciação e os ciclos de vida de produtos e a volatilidades de mercado e suas incertezas; sendo assim, a ampliação do processo, aceleração e redução do processo e o desenvolvimento da planta precisam ser discutidos e testados (LIER et al., 2018). Os mesmos autores também comentam que as estratégias tradicionais de escalonamento são normalmente

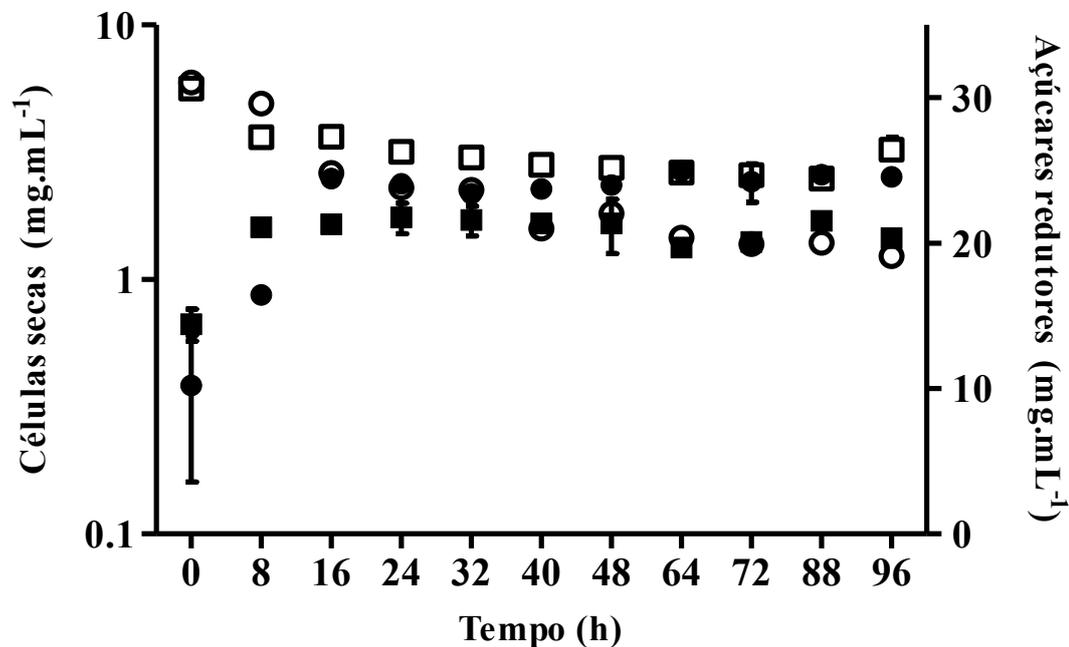
baseadas em um teste sucessivo e gradual de aumento de escala com um aumento das dimensões do aparato e análise dos parâmetros envolvidos.

5.2 APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM BIOPROCESSAMENTO

5.2.1 Crescimento da *R. eutropha*

O hidrolisado obtido no aumento de escala foi avaliado como fonte de carbono para crescimento microbiológico. O mesmo foi testado utilizando a bactéria *R. eutropha* ATCC17699, a qual possui ótimos resultados para produção de PHA quando limitada em nitrogênio. Os experimentos realizados compararam o crescimento bacteriano em meio contendo o hidrolisado e outro meio contendo glicose sintética. A Figura 17 apresenta os dados obtidos de crescimento bacteriano em células secas e o consumo de açúcares redutores no cultivo durante o tempo de 96h.

Figura 17 – Cinética de crescimento de *R. eutropha* e consumo de açúcares redutores. (□) Açúcar redutor cultivo glicose; (○) Açúcares redutores cultivo hidrolisado; (■) Células secas cultivo glicose; (●) Células secas cultivo hidrolisado.



O ensaio contendo o hidrolisado apresentou um maior crescimento em células secas, chegando a 2,5 mg.mL⁻¹ e consumindo cerca de 40 % do açúcar disponível no meio de cultivo. A análise do teor de glicose acompanha o consumo de açúcares no cultivo, tendo a glicose como consumo preferencial, como fonte de carbono. O teor de celobiose teve decréscimo de 10 % a partir de 16 h de cultivo, permanecendo constante até o final do mesmo.

No cultivo controle utilizando-se apenas de glicose, o microrganismo não teve seu crescimento igual ao cultivo contendo hidrolisado como fonte de carbono, tendo seu crescimento em 16 h o total de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de células secas e o açúcar redutor reduzindo de 31 mg.mL^{-1} para 24 mg.mL^{-1} . Em ambos os cultivos não houve a produção de PHA, conforme as análises realizadas.

Embora, a utilização de resíduos seja vantajosa, a presença de impurezas e a variação nas composições de resíduos por hora resulta em diferentes rendimentos finais de produção de PHA (DIETRICH et al., 2019; IVANOV et al., 2014; RAZA; ABID; BANAT, 2018), o que pode ter ocasionado a não produção do biopolímero nos cultivos. O efeito da relação carbono/nitrogênio (C/N) no crescimento celular e no acúmulo de PHA têm influência no processo de produção dos mesmos. Geralmente, um aumento da relação C/N promove o acúmulo de PHA, enquanto o efeito reverso pode ser observado para o crescimento celular (AHN; JHO; NAM, 2015; RAZA; ABID; BANAT, 2018). Normalmente, a produção de PHA ocorre durante a fase estacionária. Assim, as células são primeiro cultivadas através de fase exponencial em um meio equilibrado para maximizar a taxa de crescimento. Este meio é formulado para ficar sem um nutriente chave quando a população máxima de células é alcançada, então o carbono adicional é adicionado de modo descontínuo alimentado ou contínuo para maximizar a produção de PHA (CHAKRABORTY; MUTHUKUMARAPPAN; GIBBONS, 2012).

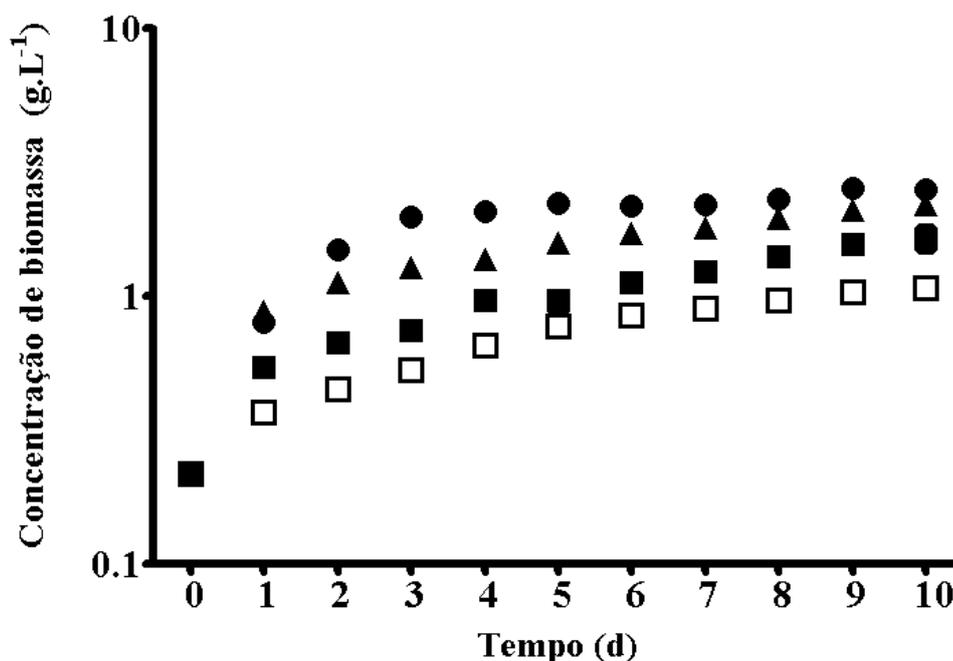
O acúmulo de PHA sob condições de estresse está bem documentado. Portanto, as condições de cultura sob as quais as bactérias produtoras de PHA são cultivadas, e nível de nutrientes, pH, taxa de aeração, tempo de cultivo, etc. podem alterar a composição até certo ponto. O pH descontrolado pode levar a um decréscimo no rendimento de PHA devido ao maior estresse de pH e maior necessidade de manutenção (SINGH et al., 2015). Como não houve controle do pH durante o cultivo, não se pode afirmar essa possibilidade de o pH ter comprometido a produção do polímero.

5.2.2 Crescimento da *Chlorella fusca*

O hidrolisado obtido no aumento de escala foi avaliado como fonte de carbono para crescimento de microalgas. O mesmo foi testado utilizando a cepa *C. fusca* LEB 111 em meios cultivos controle e meios contendo hidrolisado (1, 5 e 10 % v:v) com redução de nitrogênio, visando um possível incremento do crescimento e da produção de PHA pela microalga. A redução de nitrogênio e adição de diferentes fontes de carbono tem sido relatada em trabalhos do grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG (BRAGA et al.,

2019; CASSURIAGA et al., 2018). A Figura 18 apresenta os dados obtidos para o crescimento da microalga *C. fusca* em diferentes meios estudados por 10 dias de cultivo.

Figura 18 – Cinética do crescimento de *C. fusca* LEB18 em diferentes meios de cultivo: (□) Controle; (■) 1 % hidrolisado; (▲) 5 % hidrolisado; (●) 10 % hidrolisado. □



Os cultivos contendo hidrolisado obtiveram maior crescimento celular, sendo que os cultivos de 5 e 10 % de hidrolisado obtiveram concentração celular máxima (X_{max}) de 2,2 e 2,5 $g.L^{-1}$ respectivamente, sem diferença estatística ($p < 0,05$). O cultivo controle contendo como fonte de carbono o carbonato obteve um desempenho de 50 % do crescimento obtido nos cultivos contendo 5 e 10 % de hidrolisado. A produtividade máxima (P_{max}) dos cultivos contendo 5 e 10 % de hidrolisados alcançou 0,66 e 0,69 $g.L^{-1}d^{-1}$ e não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$), alcançando uma relação 4x superior em relação ao cultivo controle. Os dados de concentração de biomassa máxima e produtividade máxima são apresentados na Tabela 11.

A velocidade específica máxima (μ_{max}) e o menor tempo de geração foram obtidos no cultivo contendo 10 % de hidrolisado. O cultivo controle apresentou μ_{max} maior que os cultivos contendo 1 e 5 % de hidrolisado, sendo que estes últimos não diferiram entre si estatisticamente ($p < 0,05$). O gráfico da variação do pH dos cultivos é apresentado na Figura 19 e não apresentaram desvios significativos, demonstrando que a aplicação do hidrolisado, apesar de o mesmo estar em meio de tampão, não interferiu nos cultivos. Os cultivos contendo hidrolisados tiveram seu pH no início em faixas entre 6,0 e 7,0, alcançando valores entre 8,5 e 9,5 a partir do segundo dia e permanecendo nesta faixa durante todo o cultivo, demonstrando

que não foi característica influente no período de cultivo. Pode-se afirmar que, entre o pH 6 e 10, a forma mais dominante de CO₂ disponível na água é o bicarbonato (forma não gasosa) e as microalgas possuem formas ativas de concentrar os íons de bicarbonato no interior da célula. O bicarbonato é imediatamente desidratado pela anidrase carbônica e o CO₂ gerado é fixado pela RuBisCO na atividade do ciclo de Calvin, para criar duas moléculas de 3-fosfoglicerato (MONDAL et al., 2016).

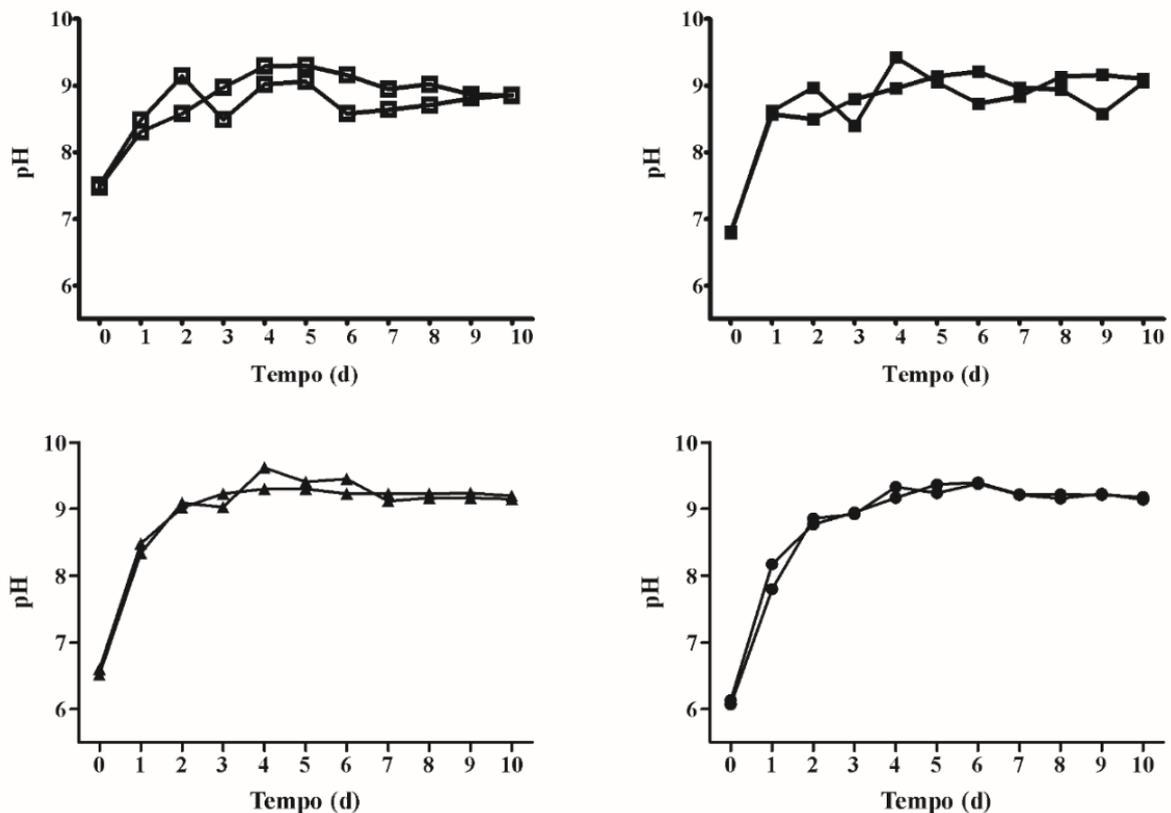
Tabela 11 – Concentração celular máxima (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e tempo de geração (T_g) do cultivo de *C. fusca* para cada cultivo.

	Controle	H1%	H5%	H10%
X_{max} (g.L⁻¹)	1,067±0,05 ^c	1,648±0,16 ^b	2,187±0,10 ^a	2,538±0,09 ^a
P_{max} (g.L⁻¹.d⁻¹)	0,150±0,02 ^c	0,325±0,03 ^b	0,662±0,02 ^a	0,692±0,00 ^a
μ_{max} (d⁻¹)	0,172±0,01 ^b	0,117±0,00 ^c	0,106±0,00 ^c	0,452±0,00 ^a
Δt	1-6	2-9	2-6	1-3
R²	0,989±0,00	0,978±0,00	0,984±0,00	0,954±0,01
T_g (d)	4,034±0,24 ^b	5,925±0,10 ^a	6,517±0,19 ^a	1,534±0,01 ^c

Letras sobrescritas idênticas na mesma linha para o mesmo parâmetro indicam que as médias não diferem significativamente no nível de confiança de 95 % (p > 0,05). H1%, H5% e H10% são cultivos contendo 1, 5 e 10 % de hidrolisado (v:v).

Alguns estudos observaram que uma maior biomassa e produtividade lipídica de *Chlorella* sp. poderia ser obtida sob condições mixotróficas e heterotróficas. Heredia-Arroyo et al. (2011) testaram diferentes formas de cultivo (autotrófico, mixotrófico e heterotrófico) utilizando *C. vulgaris*, apresentando valores de biomassa (g.L⁻¹) de 0,4; 1,4 e 0,75 respectivamente no cultivo controle e obtendo, em cultivo contendo 15 g.L⁻¹ de glicose, um P_{max} de 1.62 g.L⁻¹.d⁻¹, utilizando fonte de carbono normal (extrato de levedura 0,5 g.L⁻¹). Liang, Sarkany e Cui (2009) aplicaram diferentes concentrações de glicose e glicerol no crescimento de *C. vulgaris*, alcançando X_{max} de 1,6 e 1,5 g.L⁻¹ em cultivos com 1 % e 2 % de glicose, respectivamente, e com produtividade de 0,254 e 0,244 g.L⁻¹.d⁻¹ para os mesmos cultivos. Os mesmos autores testaram também 5 e 10 % de glicose, cultivos que apresentaram menores dados de crescimentos. Yeh, Chen e Chang (2012) efetuaram testes com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, glicerol e acetato de sódio) utilizando *C. vulgaris* e obtiveram o maior valor de X_{max} de 3,5 g.L⁻¹ nos cultivos contendo 10 g.L⁻¹ de glicose e sendo que a microalga utilizou 68 % do açúcar disponível no seu cultivo para alcançar este montante de biomassa.

Figura 19 – pH dos cultivos de *C. fusca* LEB18 em diferentes meios de cultivo: (□) Controle; (■) 1 % hidrolisado; (▲) 5 % hidrolisado; (●) 10 % hidrolisado.

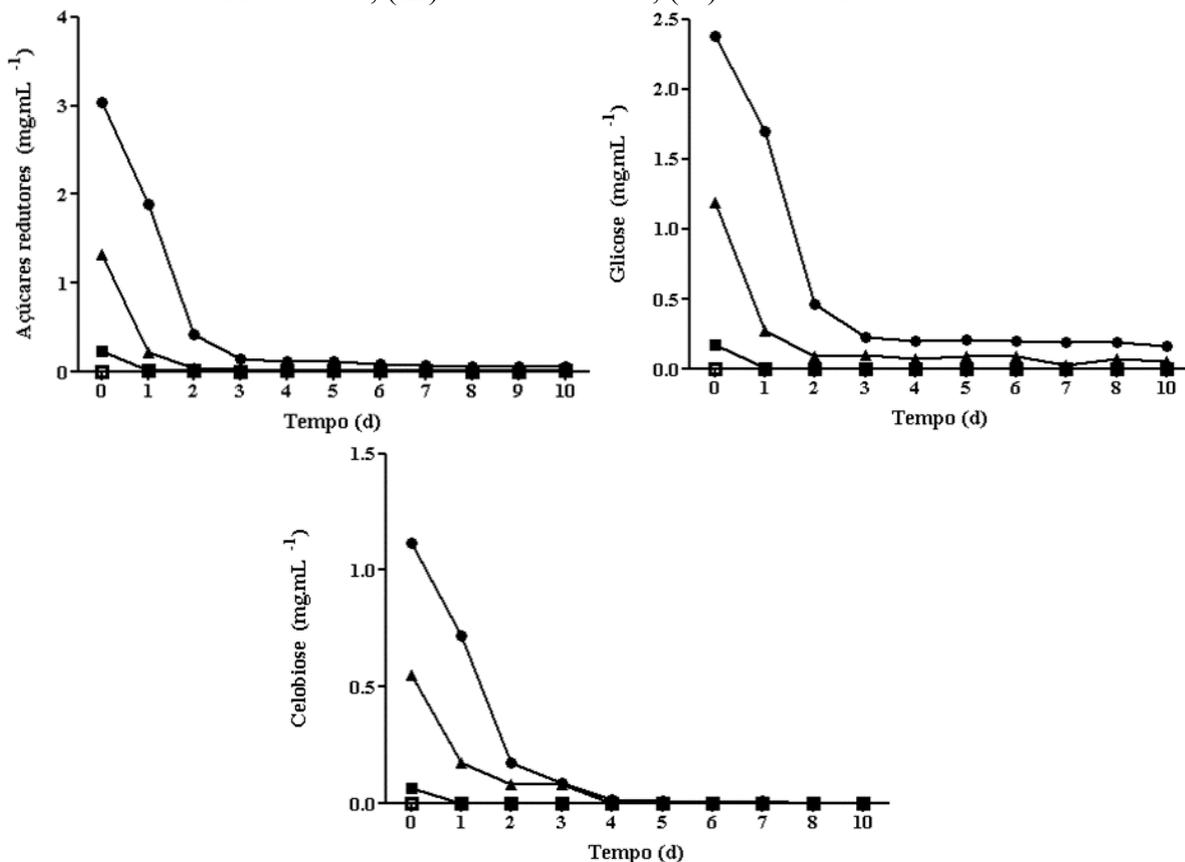


Ferreira e Costa (2017) estudaram adições diárias de glicose nas concentrações de 5, 10 e 15 g.L⁻¹ em cultivos de *C. homosphaera* buscando obter maior produtividade lipídica. Os autores observaram que para as maiores concentrações não houve o consumo de glicose, devido à provável saturação do meio de cultivo, porém a maior produção lipídica foi determinada para estes ensaios. Bhatnagar et al. (2011) e Ferreira, Holz e Costa (2018) estudaram adição de glicose em cultivos de *C. minutissima*. Ambas pesquisas aplicaram 1% de glicose nos cultivos, sendo os primeiros que estudaram a microalga em cultivos fototróficos, heterotróficos e mixotróficos e verificaram que o cultivo mixotrófico obteve a melhor quantidade de biomassa ao final do cultivo (0,22 g.L⁻¹). Os mesmos autores também cultivaram esta microalga com efluentes industriais de tecelagens somado com efluente residencial, demonstrando que *C. minutissima* tem a condição de crescer diretamente nestes meios, obtendo biomassa final entre 0,2 e 0,3 g.L⁻¹. Já Ferreira, Holz e Costa (2018) estudaram o efeito em cultivos de *C. minutissima* de adições diárias de glicose em concentrações de 1, 5 e 9 g.L⁻¹ buscando a maior produtividade lipídica da microalga. Os autores determinaram X_{max} nos ensaios contendo 5 g.L⁻¹ com boa produtividade lipídica e no ensaio contendo 9 g.L⁻¹ onde obteve o maior valor de X_{max} e a maior produtividade lipídica. Em comparação com o presente

trabalho, foi obtido melhores dados de cinética de crescimento utilizando-se o hidrolisado como fonte de carbono em crescimento mixotrófico.

Observando-se a Figura 20, o consumo de açúcar dos cultivos contendo hidrolisados se iniciaram tão logo a inoculação. No cultivo contendo 1 % hidrolisado teve seu consumo total em 24 h, já o cultivo contendo 5 % de hidrolisado teve seu término em 48 h e no cultivo contendo 10 % hidrolisado não houve consumo total até o final do cultivo (décimo dia). O teor de glicose permaneceu em cerca de 0,2 mg.mL⁻¹ no cultivo contendo 10 % hidrolisado a partir de 72 h até o final do cultivo. A microalga foi capaz de catalisar e consumir o dissacarídeo celobiose, zerando este açúcar em todos os cultivos a partir de 4 d (cultivos de 5 e 10 % de hidrolisado) e no primeiro dia no cultivo contendo 1 % de hidrolisado. Em todos os ensaios contendo hidrolisado o dissacarídeo celobiose foi totalmente consumido, restando apenas glicose para os cultivos com concentrações mais elevadas de hidrolisado.

Figura 20 – Consumo de açúcares redutores no cultivo de *C. fusca*. (□) Controle; (■) 1 % hidrolisado; (▲) 5 % hidrolisado; (●) 10 % hidrolisado. □



Segundo Lourenço (2006) apud Acosta (2012), em relação à forma de consumo da fonte de carbono, as microalgas apresentam três tipos de metabolismo: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. No metabolismo autotrófico a luz é a fonte de energia e o CO₂ a

fonte de carbono sendo convertidos em energia química pelas reações fotossintéticas das células. No metabolismo heterotrófico as células utilizam somente compostos orgânicos como fonte de carbono e energia e no metabolismo mixotrófico os organismos utilizam tanto o autotrófico como o heterotrófico, dependendo da concentração de compostos orgânicos e intensidade de luz disponível.

Com base nestas definições, pode-se afirmar que, de acordo com a Figura 20, os cultivos contendo hidrolisado apresentaram comportamento metabólico mixotrófico passando para autotrófico a partir do momento do término da fonte de carbono utilizada (hidrolisado), sendo no cultivo com 1 % em 24 h, no cultivo com 5 % em 48 h e no cultivo contendo 10 % em 72 h. Acosta (2012) também discute que, as células da *Chlorella* possuem um sistema de transporte ativo induzido para a glicose, podendo este ser controlado pela síntese da proteína ligada à membrana citoplasmática, aumentando significativamente na captação da glicose.

O crescimento autotrófico de microalgas requer, de fato, luz, CO₂, água e nutrientes, produzindo biomassa rica em lipídios, proteínas e açúcares. No entanto, algumas espécies de microalgas possuem também a capacidade peculiar de crescer em modo mixotrófico, onde o metabolismo autotrófico é integrado a um metabolismo heterotrófico, que oxida a fonte de carbono reduzido disponível no meio (CECCHIN et al., 2018; HANNON et al., 2010; WAN et al., 2011). Os principais substratos usados para o crescimento mixotrófico de microalgas são glicose, etanol, ou produtos residuais mais baratos de vários processos industriais, como acetato ou glicerol. Mesmo no caso de espécies não modelo como *Chlorella* spp. ou *Scenedesmus*, o crescimento mixotrófico é efetivo para aumentar a biomassa e a produtividade lipídica (COMBRES et al., 1994; LI et al., 2014; WAN et al., 2011).

Muitos estudos têm investigado o potencial do modo de crescimento mixotrófico para aumentar o desempenho dos sistemas de cultivo de microalgas. Neste contexto, a atenção foi dedicada à identificação de um substrato orgânico ótimo. Isso pode variar dependendo da linhagem de microalgas considerada, embora um grupo restrito de compostos candidatos seja em geral considerado. A glicose, o glicerol e o acetato demonstraram assegurar uma produtividade satisfatória por unidade de área para um grande número de diferentes estirpes (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; PAGNANELLI et al., 2014). Heredia-Arroyo et al. (2011) citam em seu estudo que os cultivos contendo menor quantidade de glicose no meio apresentaram consumo mais rápido que os ensaios submetidos a concentrações mais elevadas. Para os autores, em cultivos contendo maior quantidade de glicose inicial também não foi visualizado o consumo total dos açúcares, assim como o verificado neste trabalho, onde o cultivo contendo 10 % de hidrolisado não apresentou consumo total do açúcar. Os cultivos

foram avaliados quanto a sua composição proximal e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12 – Composição proximal e dados de produtividade de macromoléculas da biomassa de *C. fusca* para cada cultivo, em base seca.

Componente	Controle	H1%	H5%	H10%
Proteína (g.100g⁻¹)	30,87±0,88 ^a	29,26±1,44 ^a	29,49±1,65 ^a	27,69±0,49 ^a
Lipídios (g.100g⁻¹)	24,32±0,74 ^a	22,95±0,20 ^a	22,79±2,93 ^a	21,08±0,53 ^a
Carboidratos (g.100g⁻¹)	4,73±1,45 ^b	5,51±0,04 ^b	7,48±0,62 ^b	8,05±0,16 ^a
Prod. Proteínas	0,046±0,00 ^c	0,095±0,00 ^b	0,195±0,01 ^a	0,192±0,00 ^a
Prod. Lipídios	0,037±0,01 ^b	0,074±0,00 ^b	0,151±0,02 ^a	0,146±0,00 ^a
Prod. Carboidratos	0,007±0,00 ^b	0,018±0,00 ^b	0,049±0,00 ^a	0,056±0,00 ^a

Letras sobrescritas idênticas na mesma linha para o mesmo parâmetro indicam que as médias não diferem significativamente no nível de confiança de 95 % ($p > 0,05$). H1%, H5% e H10% são cultivos contendo 1, 5 e 10 % de hidrolisado (v:v).

Os teores de proteína e lipídios não mostraram diferença significativa entre todos os tratamentos propostos. Já o teor de carboidratos foi incrementado, verificando que, conforme se aumentou o % de hidrolisado adicionado no cultivo, aumentou-se o teor de carboidratos, chegando a cerca de 8 g.100 g⁻¹ no cultivo contendo 10 % de hidrolisado e diferente estatisticamente dos demais cultivos ($p < 0,05$). A produtividade de cada macromolécula (proteína, lipídio e carboidratos) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos cultivos contendo 5 e 10 % de hidrolisado adicionado, demonstrando que a geração das macromoléculas obedeceu ao aumento da concentração celular, onde o teor de macromolécula foi proporcional ao teor de biomassa do cultivo. Não foi detectada produção de PHA nos cultivos.

5.3 OBTENÇÃO DO INGREDIENTE DE FIBRA ALIMENTAR

5.3.1 Rendimentos, teor de umidade, açúcares redutores e pH do CF

A Tabela 13 apresenta os valores para rendimento do processo (fibra e secagem), teor de umidade, açúcares redutores e pH do CF obtido pela utilização de dois níveis de sólidos iniciais (substrato) na reação de hidrólise enzimática (HE). O rendimento total de fibra foi calculado com a quantidade de fibra alimentar total (FAT) seco, obtido, em relação à quantidade total de matéria-prima aplicada no processo enzimático. Isso mostra que o processo descrito foi capaz de recuperar 70 % da fibra a partir da matéria-prima, utilizando a concentração inicial de sólidos de 50 mg.mL⁻¹. O processo de liofilização apresentou um rendimento de 4,81 % e 5,43 % para 40 e 50 mg.mL⁻¹, respectivamente, indicando que, com sólidos iniciais maiores, se

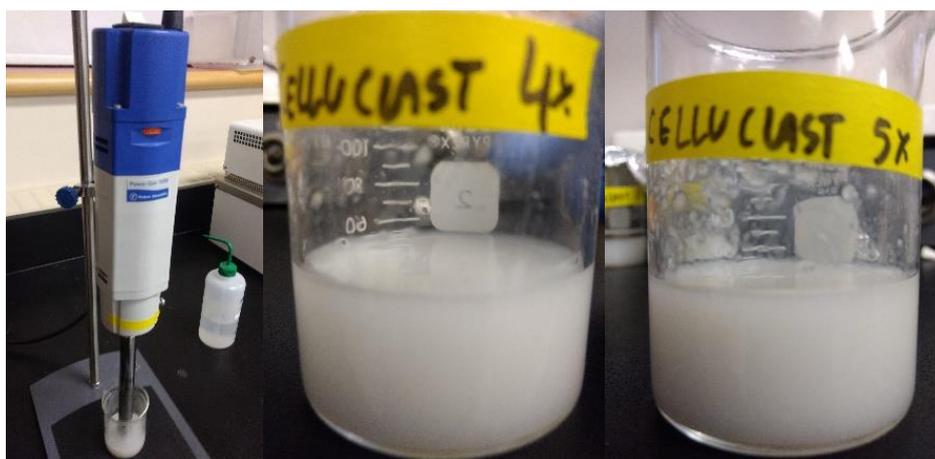
aumenta a recuperação e a quantidade de fibra seca obtida, confirmando o resultado do rendimento total de fibra. O rendimento de liofilização também é confirmado pelos valores de umidade, que não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos, apresentando que o teor de água em ambos os tratamentos não afetou os rendimentos (razão massa inicial x massa final). A Figura 21 apresenta o processo de homogeneização em alta velocidade e os produtos obtidos.

Tabela 13 – Resultados de rendimento, umidade, açúcares redutores e conteúdo de fibras da fibra alimentar obtida utilizando o envoltório celulósico residual.

	Tratamento		P-valor
	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹	
Amostras, n	3	3	
Rendimento de Fibra Total %	58,59±1,99 ^b	70,96±4,51 ^a	0,03
Rendimento de secagem %	4,81±0,14 ^b	5,43±0,60 ^a	0,01
Umidade %	4,72±0,16	4,90±0,40	0,24
Açúcar redutor total %	32,82±2,96	30,56±1,67	0,06
FAT ¹ %	42,63±1,78 ^b	50,04±3,28 ^a	<0,01
FAI ¹ %	40,14±1,54 ^b	45,27±3,88 ^a	<0,01
FAS ¹ %	2,49±0,38 ^b	4,76±0,90 ^a	<0,01
pH	4,76±0,01	4,76±0,04	0,89

Letras sobrescritas idênticas na mesma linha para o mesmo parâmetro indicam que as médias não diferem significativamente no nível de confiança de 95 % ($p > 0,05$). ¹ FAT = Fibra Alimentar Total; FAI = Fibra Alimentar Insolúvel; FAS = Fibra Alimentar Solúvel.

Figura 21 – Processo de obtenção e produto ingrediente de fibra alimentar obtido dos envoltórios celulósicos resíduos em suspensão pré-secagem.



Nos testes preliminares, em reações enzimáticas com concentrações iniciais de sólidos maiores que 50 mg.mL⁻¹, houve comprometimento da variável agitação durante a reação, pois a quantidade de sólidos era tão alta que a agitação mecânica não pôde atingir a velocidade correta para realizar a reação. A agitação, segundo Bommarius et al. (2008) e

Silveira, Rau e Andreus (2012), é uma das variáveis essenciais da reação enzimática, ajudando a enzima a dispersar-se no meio reacional, auxiliando a sua ligação com o substrato e a sua difusão através da superfície do polímero até o sítio de reação da enzima, afetando a atividade da celulase com baixo perfil de agitação.

A porcentagem de açúcares redutores (ART) foi 32 e 30 % para as concentrações de 40 e 50 mg.mL⁻¹, respectivamente, e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Isso mostra que a menor concentração de sólidos facilitou a reação enzimática da clivagem do ECRL utilizados, reafirmando que com sólidos de 40 mg.mL⁻¹, a agitação tem melhor desempenho e a enzima pode se ligar ao substrato e obtendo-se um teor de fibra menor nesta concentração. Além disso, o ART mostra que no tratamento de 50 mg.mL⁻¹, o menor valor apresenta que a enzima não clivou a cadeia de celulose a carboidratos menores, confirmando a maior quantidade de fibra detectada neste tratamento. O valor do pH para ambos os tratamentos foi semelhante, o que é justificado pelo uso do tampão citrato de sódio como meio para dispersar o ECRL e reagir com a enzima, mantendo o pH constante durante o processo enzimático e diminuindo ligeiramente pela moagem no HAV, talvez a partir da liberação de grupo hidroxila devido à degradação estrutural.

5.3.2 Teor de fibra alimentar do CF

Os valores de fibra alimentar total (FAT), fibra alimentar insolúvel (FAI) e fibra alimentar solúvel (FAS) são apresentados na Tabela 13. É possível observar que o incremento de sólidos no início da reação enzimática aumenta o teor de fibra no CF seco. O resultado do FAI e FAS obtidos para o tratamento com 50 mg.mL⁻¹ pode ser explicado pela diminuição da agitação da reação, diminuindo a capacidade da enzima de se ligar ao substrato e clivar as cadeias de celulose em moléculas menores como mono e dissacarídeos. Segundo a literatura, a hidrólise enzimática, especialmente da celulose, pode aumentar o conteúdo de FAS, quebrando o FAI em solúveis (XU et al., 2015) e diminuir o rendimento do CF devido à perda de sacarídeos de maior tamanho durante a hidrólise (ELLEUCH et al., 2011). Além disso, o FAS, devido à sua baixa viscosidade, pode ser incluído na dieta em quantidades que podem beneficiar a saúde humana sem ter um efeito negativo na textura do produto (sobretexturização) (MOCZKOWSKA et al., 2019).

Os processos de obtenção de fibra alimentar são muito complexos e caros, e ainda há a possibilidade de comprometimento do rendimento de extração e da funcionalidade dos extratos obtidos. Portanto, ainda é um desafio obter fibra alimentar pura sem quaisquer impurezas, como proteínas ou lipídios (MOCZKOWSKA et al., 2019). O ECRL é uma matéria-

prima de alto conteúdo de celulose e sem significativa quantidade de proteínas ou lipídios, com custo muito baixo, é obtido como resíduo de produção industrial de salsicha, possuindo alto potencial para ser utilizado como fonte de fibra. A principal dificuldade é a de se diminuir o tamanho das suas partículas, sendo esta a principal justificativa para a aplicação da HE e da HAV.

O alto consumo de fibra alimentar é uma maneira eficiente de reduzir o risco de doenças cardiovasculares por seus efeitos hipolipidêmicos. Em relação às diferentes fontes e métodos de extração, existem FAS e FAI, que são importantes por suas características físico-químicas e pela funcionalidade nutricional. As fibras alimentares possuem diversos tipos de fontes sendo as mais importantes as agroindustriais e resíduos industriais e podendo estas serem aplicadas numa matriz alimentar (LÓPEZ-MARCOS et al., 2015; LUO et al., 2018).

As tecnologias de processamento podem efetivamente melhorar as propriedades físico-químicas e nutricionais dos vários tipos de fibra alimentar (LIU et al., 2016). A HE foi descrita como um método eficiente, utilizando os preparados enzimáticos Celluclast® 1.5L® e Viscozyme L®, estes escolhidos devido à sua alta atividade xilanolítica e celulolítica (WIKIERA et al., 2015). As fibras alimentares modificadas por vários métodos, mostraram várias diferenças e graus de avanço nas estruturas, propriedades físico-químicas e funcionais (YU et al., 2018). Liu et al. (2016) relataram que no processamento para obtenção da fibra utilizando HAV em vários minutos poderia desintegrar a estrutura da fibra e até mesmo degradar o polissacarídeo, perdendo o efeito nutricional de fibra alimentar.

5.3.3 Capacidades de retenção de água, retenção de óleo e inchamento do CF

As capacidades de inchamento (SW), retenção de água (CRA) e retenção de óleo (CRO) do CF obtido estão apresentados na Tabela 14. SW e CRA são duas propriedades de hidratação que são determinadas pelo conteúdo de água versus componentes de fibra (FAI e FAS) e cujos valores entre ambas devem mostrar uma similar tendência, face serem características hídricas da fibra (CADDEN; SOSULSKI, 1982; KIM et al., 2018). O CRA é definido como a característica de um material de reter água quando submetido a forças externas e o SW é definida como o volume de água ocupado pela amostra quando hidratada, apresentando normalmente maior valor quando a quantidade de FAS é maior no conteúdo total de fibras (LUO et al., 2017). Além da composição química da fibra, algumas propriedades físicas como estrutura, tamanho de partículas, porosidade e densidade são importantes para interpretar o comportamento das amostras durante a hidratação (AUFFRET et al., 1994; YAN et al., 2018).

Tabela 14 – Capacidades de inchamento, de retenção de água (CRA) e de retenção de óleo (CRO) da fibra alimentar obtida utilizando o envoltório celulósico residual.

	Tratamento		P-valor
	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹	
Amostras, n	3	3	
Capacidade de inchamento mL.g amostra ⁻¹	3,07±0,39 ^b	3,91±0,35 ^a	<0,01
CRA ¹ g água.g amostra ⁻¹	1,90±0,16 ^b	2,46±0,19 ^a	<0,01
CRO ² g óleo.g amostra ⁻¹	2,82±0,47 ^a	2,67±0,19 ^a	0,38

Letras sobrescritas idênticas na mesma linha para o mesmo parâmetro indicam que as médias não diferem significativamente no nível de confiança de 95 % ($p > 0,05$). ¹ CRA = Capacidade de retenção de água; ² CRO = Capacidade de retenção de óleo.

O tratamento contendo 50 mg.mL⁻¹ de sólidos inicialmente no processo enzimático apresentou valores mais elevados de SW e CRA, o que poderia ser justificado pelo fato deste tratamento apresentar maior FAS em sua composição, confirmando o que foi descrito por Lan et al. (2012), que descreve que as capacidades de água (SW e CRA) estão positivamente correlacionadas com o conteúdo FAS das fibras, mas negativamente relacionadas com a quantidade de FAI. Além disso, segundo Ma e Mu (2016), quando o FAS apresenta grupos mais hidrofílicos em sua estrutura, aumenta a área de superfície e proporciona maiores sítios de ligação de água, aumentando o SW e o CRA. Maphosa e Jideani (2016) descrevem que operações mecânicas como a moagem quebram a rede de fibras expondo grupos hidroxila, o que pode aumentar a área de superfície e o rendimento da extração. No entanto, o desgaste excessivo resulta em CRA reduzida devido à extensa interrupção da fibra e solubilização do polímero.

A capacidade de retenção de óleo (CRO) é definida como a capacidade das fibras para evitar perda de gordura durante o processamento de alimentos. Fibras com maior OBC podem ser utilizados em formulações alimentícias com o objetivo de reduzir os níveis séricos de colesterol pela ligação da gordura saturada com a fibra durante a digestão humana (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Os valores de CRO não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, sendo os valores de massa de óleo por massa de fibra de 2,82 e 2,67 g.g⁻¹ para as concentrações iniciais de 40 e 50 mg.mL⁻¹, respectivamente. As diferenças na OBC poderiam ser devidas ao aumento da área superficial e da matriz de fibras danificadas, sendo que quanto menor o tamanho das partículas, maior a CRO (MAPHOSA; JIDEANI, 2016)

Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos encontrados por Meng-Mei e Tai-Hua (2016) que utilizaram como matéria-prima o cominho (5,17 a 5,72 g.g⁻¹) e Wang et al. (2016) que utilizaram como matéria-prima o farelo de arroz, porém superior a alguns valores para fibras de frutas (manga, maracujá, abacaxi e goiaba), conforme descrito por Martínez et

al. (2012) cujos valores apresentaram-se entre 0,7 a 1,6 g.g⁻¹. Figuerola et al. (2005) descrevem que características de superfície, densidade de carga total e natureza hidrofóbica podem contribuir para o CRO das fibras. Reduzir o tamanho das partículas, por um lado, aumentaria a área da superfície e permitiria uma interação mais superficial com o óleo. No entanto, por outro lado, a matriz de fibras pode ser danificada durante a redução de tamanho, o que reduz a retenção de óleo pela estrutura física (WANG et al., 2016).

5.3.4 Tamanho de partícula do CF

A distribuição de tamanho de partícula (DTP) das fibras para os dois tratamentos testados é apresentada na Figura 22 e os valores de diâmetro médio de superfície (D [3,2]) e diâmetro médio de volume (D [4,3]) são apresentados em Tabela 15. As partículas maiores na suspensão têm a maior influência no diâmetro médio ponderado por volume D [4,3], enquanto as partículas menores também entram em jogo no diâmetro médio ponderado pela superfície D [3,2]. De acordo com a polidispersão do DTP das suspensões de fibra, pode ser conveniente tratar as partículas grandes e pequenas separadamente, e calcular D[3,2] para cada fração e a porcentagem de fração grossa ou fina, respectivamente (TORNERG, 2016).

Tabela 15 – Diâmetro médio de superfície D[3,2], volume médio D[4,3] e parâmetros da Lei da Potência e viscosidade aparente à 100 s⁻¹ (η_{100}).

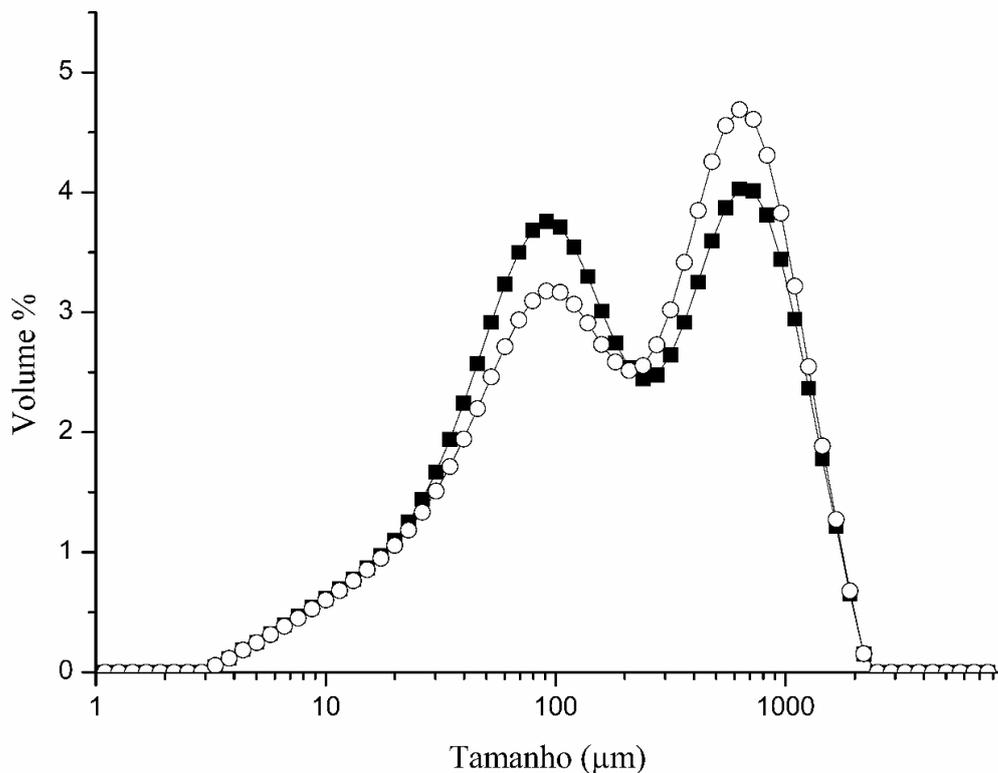
	Tratamento		P-valor
	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹	
Amostras, n	3	3	
D[3,2] μm	61,63±5,90	65,13±3,32	0,15
D[4,3] μm	346,30±34,15 ^b	377,34±22,54 ^a	0,04
K Pa.s ⁿ	0,22±0,01	0,82±0,03	
n	0,42±0,01	0,30±0,00	
RMSE ¹	0,15	0,20	
R-Quadrado	0,94	0,96	
η_{100} mPa.s	15,23±2,84 ^b	27,17±14,80 ^a	0,04

Letras sobrescritas idênticas na mesma linha para o mesmo parâmetro indicam que as médias não diferem significativamente no nível de confiança de 95 % ($p > 0,05$). ¹ RMSE = raiz quadrada do erro do quadrado médio

O comportamento de ambas as curvas do DTP é semelhante, com distribuição de tamanho multimodal, mostrando que as partículas estão polidispersas na solução. Pode-se observar na figura que o tratamento contendo sólidos de 50 mg.mL⁻¹ apresenta um menor volume de partículas na região de menor pico (em torno de 80 μm) e maior volume de partículas no segundo pico (em torno de 850 μm), confirmando os valores de fibra alimentar obtidos, cuja concentração apresentou maior valor para FAT. O tamanho inicial de partícula do ECRL, que é de 4500 μm , foi efetivamente reduzido após o efeito combinado da reação enzimática e da

quebra mecânica feita pelo HAV, o que é tecnologicamente benéfico, pois afeta a estrutura, a porosidade e a área de superfície da fibra, levando a mudanças nas propriedades físico-químicas e funcionais, demonstrando a eficácia desta combinação de métodos utilizada neste experimento para se obter as fibras como um ingrediente alternativo a ser incorporado em produtos alimentícios.

Figura 22 – Distribuição do tamanho de partícula da fibra alimentar obtida utilizando envoltório de celulose resíduo. (■) 40 mg.mL⁻¹ de substrato; (○) 50 mg.mL⁻¹ de substrato.



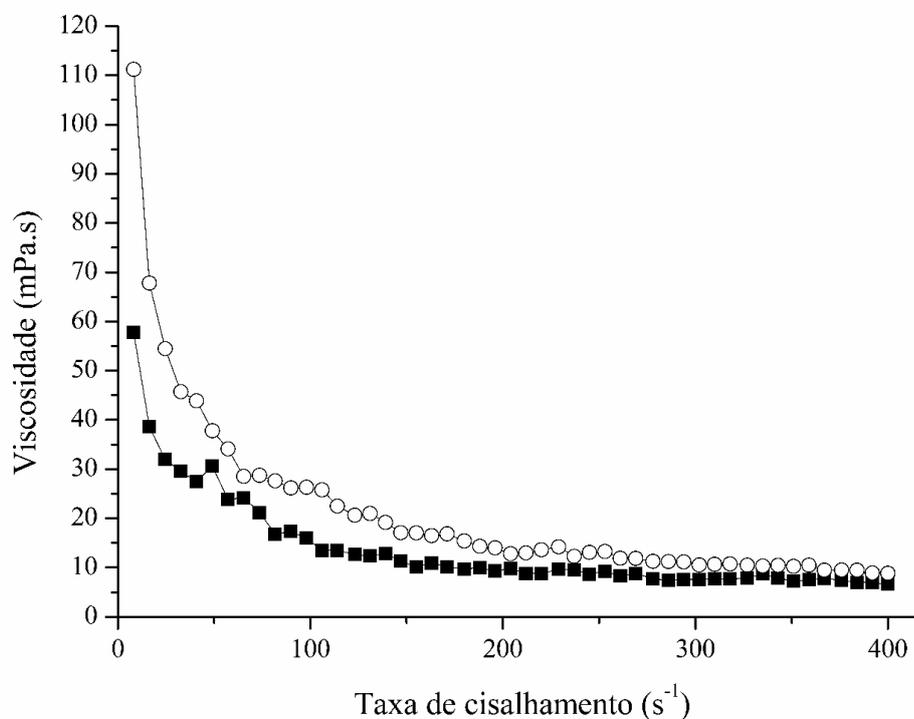
A CRO está relacionada com a natureza da superfície e a densidade ou espessura das partículas, de modo que aquelas partículas com a maior área superficial e, por consequente menor tamanho de partícula, apresentam teoricamente uma maior capacidade de adsorver e ligar componentes de natureza lipídica. Wuttipalakorn, Srichumpuang e Chiewchan (2009) relataram que uma redução no tamanho das partículas da fibra alimentar dos resíduos de limão diminui os valores de SW e CRA, sob o ponto de vista da matéria-prima contra a fibra tratada. A solubilidade é limitada pelo tamanho dos polímeros/coloides que podem se dissolver. Isso está na faixa de 100 nm - 1 μm para polissacarídeos na água, acima do qual normalmente seria esperado que estes se separassem em várias fases, apresentando-se insolúveis (GIDLEY; YAKUBOV, 2019). Mudanças nas propriedades tecnológicas da fibra alimentar também podem ser alcançadas alterando a DTP e a concentração da FAS, principalmente alterando o

grau de agregação, a forma das partículas de fibra e sua proximidade entre si, levando também a mudanças no comportamento reológico e nas respostas à hidratação (BENGTSSON; TORNERG, 2011).

5.3.5 Viscosidade aparente e comportamento reológico do CF

A reologia é uma característica chave das suspensões de fibra, uma vez que pode refletir o comportamento deste material em diferentes processos industriais, por exemplo, na mistura, bombeamento ou revestimento. As suspensões do CF possuem propriedades pseudoplásticas, isto é, sua viscosidade diminui enquanto a taxa de cisalhamento aumenta, como demonstrado na Figura 23. As suspensões de CF também são tixotrópicas, ou seja, quanto mais tempo forem submetidas à tensão de cisalhamento, menor será sua viscosidade e levará algum tempo para atingir um nível de equilíbrio. Devido à dependência da viscosidade do fluido pseudoplástico com a taxa de cisalhamento, as medições devem ser feitas em várias taxas de cisalhamento diferentes para estabelecer curvas ou perfil de fluxo.

Figura 23 – Viscosidade aparente da fibra alimentar obtida utilizando envoltório de celulose resíduo. (■) 40 mg.mL⁻¹ de substrato; (○) 50 mg.mL⁻¹ de substrato.



A Tabela 15 apresenta os valores do modelo ajustado para Lei de Potência do modelo reológico e para fazer comparações diretas entre as diferentes concentrações, a viscosidade aparente a uma taxa de cisalhamento de 100 s⁻¹ (η_{100}) foi utilizada representando o comportamento do processo como bombeamento, agitação e mastigação, conforme sugerido

por McClemens (2016), obtendo-se valores de 15,23 mPa.s e 27,17 mPa.s para 40 e 50 mg.mL⁻¹, respectivamente, demonstrando que o tratamento com maior teor de sólidos tem maior viscosidade. Isso pode ser explicado pela quantidade de fibras no CF obtido, o qual, utilizando-se 50 mg.mL⁻¹, apresentou também valores maiores de FAS. Com base no modelo descrito, foi possível observar que a diminuição do tamanho de partícula da fibra usando HE e HAV resultou na diminuição da viscosidade aparente. Resultados semelhantes são apresentados por Li et al. (2018) e Zhuang et al. (2019) em seus estudos, quando apresentam aumento da viscosidade pelo aumento do teor de fibras.

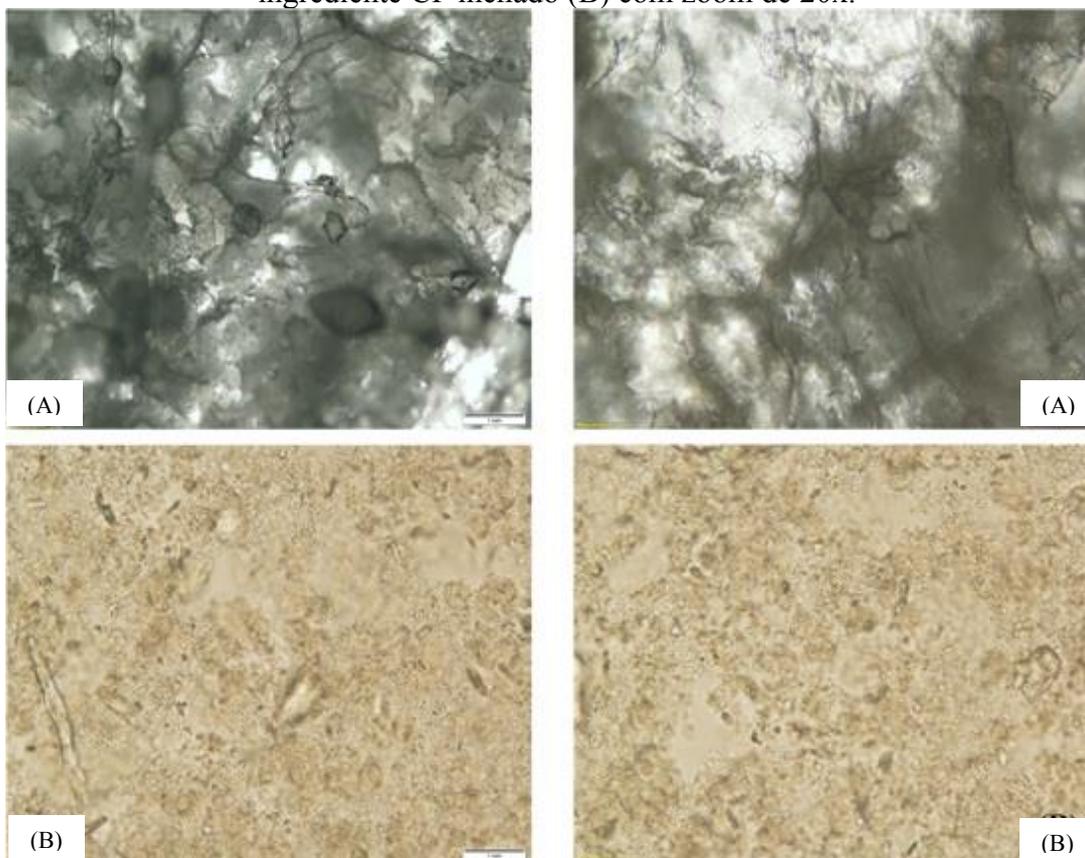
O índice de comportamento do fluxo (n) depende da distribuição de partículas pequenas e grandes e da reologia do líquido de suspensão, enquanto o coeficiente de consistência (K) depende da fração máxima de empacotamento e da distribuição de partículas pequenas e grandes (AUGUSTO; IBARZ; CRISTIANINI, 2013). O valor de K aumentou com o aumento da concentração de fibras no tratamento com 50 mg.mL⁻¹ e o valor de n , que é um indicador para o comportamento pseudoplástico por cisalhamento, foi o menor. O modelo proposto ajustou-se fortemente, apresentando coeficiente R^2 de 0,94 e 0,96 para 40 e 50 mg.mL⁻¹, respectivamente.

A viscosidade relacionada à fibra alimentar refere-se à capacidade de alguns polissacarídeos de engrossarem ou formarem géis quando misturados com fluidos resultantes de emaranhamentos físicos entre os constituintes polissacarídicos no fluido ou solução (DIKEMAN; FAHEY, 2006) e as propriedades viscoelásticas são muito úteis na concepção e previsão da estabilidade dos produtos alimentícios (AUGUSTO; IBARZ; CRISTIANINI, 2013; IBARZ; BARBOSA-CANOVAS, 2003).

5.3.6 Microscopia do CF

A estrutura do ingrediente CF, obtida com 50 mg.mL⁻¹, foi observada por meio de microscopia de luz na Figura 24. As imagens com marcador (A) apresentam o CF seco antes do uso (com zoom 4x) e com marcador (B) apresentam o ingrediente inchado com água (com zoom de 20x). Na Figura 24-A, observou-se uma estrutura porosa, que pode ser consequência do processo de liofilização, onde a água foi sublimada e os espaços ocupados pela água permaneceram na estrutura fibrosa. As bordas afiadas e distorcidas sugeriram que as fibras cruas foram expostas a cisalhamento e rasgo durante HAV, enquanto a morfologia da superfície lisa permaneceu.

Figura 24 – Imagens de microscópio do ingrediente CF seco (A) com zoom de 4x e o ingrediente CF inchado (B) com zoom de 20x.



Na Figura 24-B, estrutura fibrosa inchada foi observada com pequenas partículas de géis. Além disso, a imagem apresentava pedaços de partículas inteiras e não inchadas.

5.4 APLICAÇÃO DO CF OBTIDO EM EMULSÕES MODELO

5.4.1 Perda de cozimento e estabilidade de emulsão

A capacidade de retenção de água mede a capacidade de um sistema reter a umidade durante o processamento ou a cocção (HAYES et al., 2011). Inerentes às suas propriedades funcionais, os ingredientes ricos em fibra alimentar geralmente têm um efeito profundo na capacidade de retenção de água. Quando adicionada a produtos cárneos, a fibra alimentar pode provocar melhor capacidade de retenção de água com vários mecanismos diferentes, incluindo a retenção física de água, uma alteração no pH e uma melhor ligação de outros componentes (proteínas, lipídios e outros carboidratos).

A perda de cozimento mede a capacidade do sistema de emulsão de se ligar à água e aos lipídios após a desnaturação e agregação da proteína durante o cozimento. Enquanto isso, explica a capacidade de um sistema de carne reter água, ele também agrupa a capacidade de

retenção de água junto com os lipídios perdidos durante o cozimento, ou a capacidade de retenção de lipídios. Um teste adicional que pode ser usado para interpretar melhor a capacidade de retenção de água e a capacidade de retenção dos lipídios são testes de estabilidade de emulsão. A maior estabilidade da emulsão é muito importante em produtos de carne, tanto do ponto de vista tecnológico quanto econômico (MEHTA et al., 2015).

A incorporação de fibra aos produtos cárneos pode permitir maior capacidade de retenção de água e maior capacidade de retenção de lipídios, diminuindo assim a migração da água da matriz de carne cozida (PETRACCI et al., 2013). É com este raciocínio, que a hipótese de que a substituição total ou parcial de um ingrediente aglutinante comercial por CF poderia ser realizada sem sacrificar as propriedades tecnológicas das emulsões de carne. Infelizmente, isso não foi observado, e a causa disso começou com a incapacidade do ingrediente CF de reter efetivamente água e lipídios.

Os valores obtidos para perda de cozimento e estabilidade da emulsão (liberação de água, liberação de lipídios e liberação total de líquidos) foram apresentados na Figura 25 e na Figura 26, respectivamente. As médias obtidas por cada tratamento diferiram entre si ($p < 0,05$). A perda de cozimento aumentou quando o nível de inclusão do CF aumentou de 0 % para 100 %. A perda de cozimento não foi diferente entre 0 % CF e 25 % CF, mas quando CF foi aumentada para 50 % em substituição do emulsificante comercial, a perda de cozimento aumentou de 1,50 % em 25 % CF para um nível de 12,22 % para 50 % CF. A partir deste nível, a perda de cozimento teve níveis ainda maiores a 75 % de CF (18,07 %) e 100 % de CF (19,18 %).

O nível de perda de cozimento observado com CF superior a 25 % pode ter sido causado por vários fatores diferentes, incluindo pH próximo ao ponto isoelétrico da carne, e a baixa capacidade dos fragmentos de celulose não organizados de se unir e reter água no sistema de emulsão (MEHTA et al., 2015). Além disso, Schuh et al. (2013) discutem que a carga de hidrocolóides (por exemplo, carboximetilcelulose e celulose microcristalina) pode ter um papel fundamental na atividade da água. Enquanto esses pesquisadores atribuíram à celulose como um polímero não iônico (de carga neutra), eles relataram que a modificação da celulose pode afetar o estado carregado. Assim, é hipotetizado que a modificação realizada com o ingrediente CF (hidrólise enzimática e tratamento de homogeneização em alta velocidade) criou junto de monômeros carregados anionicamente, mas o estado desses grupos carregados não criou um ambiente propício para a ligação com a carga positiva das proteínas de carne.

Figura 25 – Perda de cozimento apresentada pelas emulsões modelo de carne, preparadas com fibra de celulose (CF).

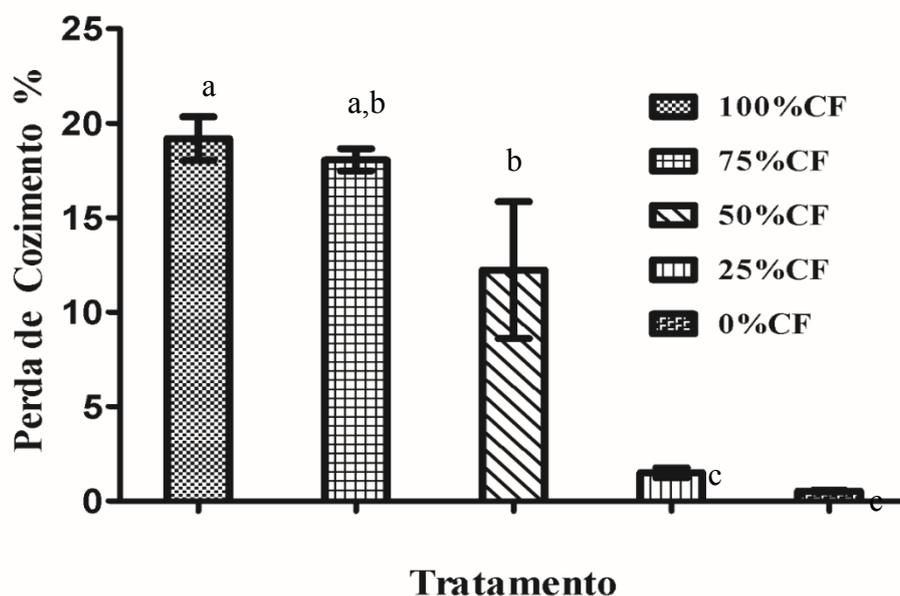
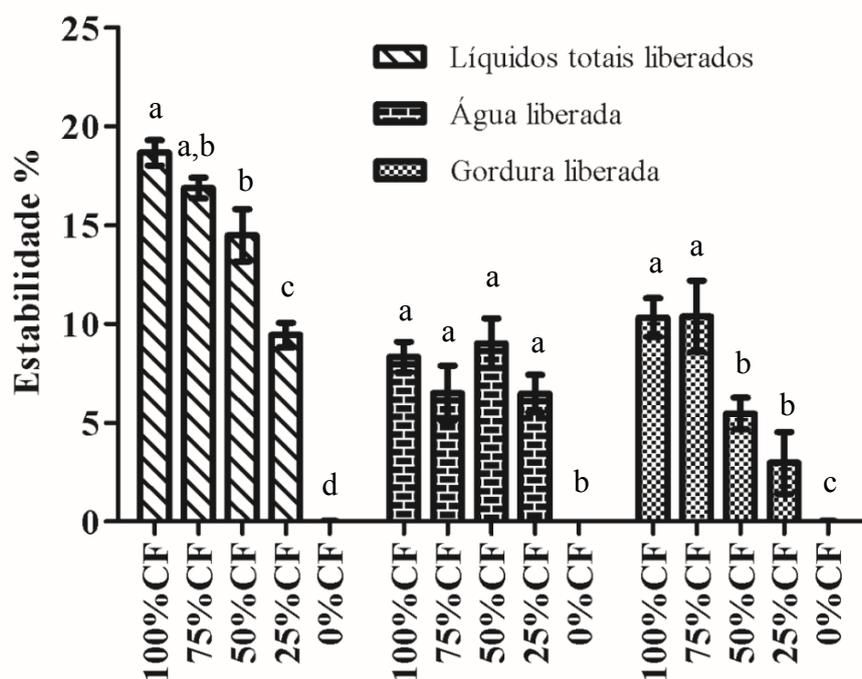


Figura 26 Estabilidade apresentada pelas emulsões modelo de carne, preparadas com fibra de celulose (CF).



A água liberada não foi diferente ($P > 0,05$) entre 25 % de CF, 50 % de CF, 75 % de CF e 100 % de CF. A gordura liberado não foi diferente ($P > 0,05$) entre 25 % de CF e 50 % de CF, contudo houve uma diferença entre 25 % de CF e 50 % de CF, em comparação com 75 % de CF e 100 % de CF. Resumindo, houve níveis nos quais o líquido total libertado se torna uma inaceitável perda (como medido com os testes de estabilidade da emulsão) com todos os

tratamentos em que o ingrediente CF foi incluído na formulação, contudo este nível foi aumentado linearmente à medida que mais ingrediente CF foi incluído na formulação.

5.4.2 Composição química proximal, conteúdo de fibra alimentar e pH da emulsão modelo

A composição química proximal de macronutrientes (umidade, lipídios, proteína e cinzas), teor de fibra alimentar e pH diferiram entre os tratamentos ($P < 0,01$) e são mostrados na Tabela 16. Para cada parâmetro houve também um efeito linear ($P < 0,01$). O conteúdo de umidade, lipídios e proteína diminuiu com o aumento do nível de inclusão de CF, enquanto as cinzas, fibras alimentares totais, fibras insolúveis totais e fibras solúveis totais aumentaram com o aumento do nível de inclusão de CF. Os líquidos liberados durante o processo de cozimento (como lipídios e proteínas solúveis) foram provavelmente a causa das diferenças observadas na composição de macronutrientes das emulsões. A inclusão de CF nas formulações de carne diminuiu a retenção de água e capacidade de retenção de óleo da formulação, o que causou a composição aproximada das emulsões de carne para diferir. Mesmo assim, todas as formulações estavam de acordo com a exigência de nível de proteína para salsichas ($> 0,5\%$), de acordo com a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (CFIA, 2018).

Tabela 16 – Composição proximal e pH de emulsões de carne cozidas preparadas com ingrediente de fibra de celulose (CF).

	Tratamentos					DPM ³	Tratamento	Efeitos Lineares
	0% CF ¹	25% CF ¹	50% CF ¹	75% CF ¹	100% CF ¹			
Amostras, n	3	3	3	3	3			
Umidade, %	58,91 ^{ab}	59,55 ^a	58,89 ^{ab}	58,93 ^{ab}	57,81 ^b	9,99	0,01	0,01
Lipídios, %	14,91 ^a	14,41 ^b	14,14 ^b	13,55 ^c	13,55 ^c	9,01	<0,001	<0,001
Proteína, %	13,63 ^a	13,28 ^b	13,12 ^b	12,39 ^c	11,68 ^d	0,06	<0,001	<0,001
Cinzas, %	2,39 ^d	2,54 ^c	2,66 ^b	2,71 ^b	2,83 ^a	0,02	<0,001	<0,001
FAT ²	2,72 ^d	3,41 ^c	3,87 ^c	4,57 ^b	5,85 ^a	0,10	<0,001	<0,001
FAI ²	2,72 ^d	3,41 ^c	3,84 ^c	4,54 ^b	5,76 ^a	0,10	<0,001	<0,001
FAS ²	0,00 ^c	0,00 ^c	0,05 ^b	0,06 ^b	0,13 ^a	0,01	<0,001	<0,001
pH	6,04 ^a	5,70 ^b	5,58 ^{bc}	5,54 ^c	5,37 ^d	0,03	<0,001	<0,001

Médias dentro de uma linha de tratamentos experimentais sem um sobrescrito comum diferem ($P \leq 0,05$).

¹ CF = Ingrediente de fibra de celulose; ² FAT = Fibra alimentar total; FAI = Fibra alimentar insolúvel; FAS = Fibra alimentar solúvel; ³ DPM = Desvio padrão da média.

Como esperado, o teor de fibra alimentar foi incrementado com o aumento do nível de inclusão de CF, com o maior nível de inclusão (100 % CF) com maior teor de fibra alimentar. A maior parte deste teor de fibra alimentar era de fibra insolúvel. Embora o teor de fibra solúvel

também tenha sido maior para o tratamento com 100 % de CF (0,13%), provavelmente não estava em um nível significativo para benefício nutricional. A fibra alimentar pode melhorar os atributos tecnológicos em produtos de carne, como capacidade de retenção de água e capacidade de retenção de lipídios, reduzindo assim o encolhimento, melhorando a perda de cozimento e melhorando a perda de purga durante os períodos de armazenamento. No entanto, o ingrediente usado neste estudo não provocou esses benefícios previstos.

O pH foi talvez o mais notavelmente alterado pela inclusão de CF, uma vez que o pH foi menor quando o nível de inclusão de CF aumentou, com uma diferença de 0,67 unidades entre 0 % de CF e 100 % de CF. Os valores obtidos para o pH das emulsões variaram de 5,37 a 6,04. A alta substituição (100 % CF) do emulsificante comercial apresentou o menor valor para o pH quando comparado com outros tratamentos. Isto foi devido à metodologia utilizada para obter as amostras do CF. O envoltório de salsicha residual foi obtido com hidrólise enzimática onde o pH foi controlado a 4,8 usando tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹. O pH final do CF foi de 4,76. Em sistemas cárneos, a variação do pH pode alterar significativamente a capacidade de ligação da água e a estabilidade da emulsão (HEMUNG; BENJAKUL; YONGSAWATDIGUL, 2013; YOUNG et al., 2005), com o consenso geral de que uma mistura de carne se aproxima do ponto isoelétrico das principais proteínas de carne (miosina = 5,4; actina = 4,8), que a capacidade de retenção de água é significativamente comprometida.

5.4.3 Análise do perfil de textura (APT) da emulsão modelo

Os valores obtidos para a análise do perfil de textura (APT) são mostrados na Tabela 17. Todos os parâmetros medidos (dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade) diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos e tiveram um efeito linear significativo. Todas medições realizadas (dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade) diminuíram à medida que o nível de inclusão de CF foi aumentado.

Vale a pena notar que o perfil de textura foi único nas amostras 0 % de CF neste estudo, em comparação com pesquisas anteriores em emulsões de carne. Os valores foram duas a três vezes maiores neste estudo em comparação com aqueles apresentados em outros estudos realizados no mesmo laboratório de pesquisa (HUANG et al., 2019; MEJIA; DE FRANCISCO; BOHRER, 2019; YOUSSEF; BARBUT, 2009). Uma causa provável para isso poderia ser a formulação dos modelos de emulsão neste estudo e a alta estabilidade da emulsão no tratamento com 0 % de CF.

Tabela 17 – Análise de perfil de textura (TPA) de emulsões de carne preparadas com ingrediente de fibra de celulose (CF).

	Tratamentos					DPM ³	Tratamento	Efeitos Lineares
	0% CF ¹	25% CF ¹	50% CF ¹	75% CF ¹	100% CF ¹			
Amostra, n	3	3	3	3	3			
Dureza, N	184,18 ^a	80,22 ^b	44,07 ^c	31,91 ^c	31,61 ^c	5,92	0,01	0,01
Elasticidade, mm	0,86 ^a	0,87 ^a	0,73 ^{ab}	0,60 ^{bc}	0,51 ^c	0,05	<0,001	<0,001
Coesividade	0,66 ^a	0,37 ^b	0,33 ^b	0,31 ^b	0,28 ^b	0,02	<0,001	<0,001
Gomosidade, N	120,23 ^a	29,83 ^b	15,02 ^c	9,95 ^c	8,97 ^c	2,66	<0,001	<0,001
Mastigabilidade, N.mm	102,74 ^a	25,85 ^b	11,55 ^c	6,24 ^c	4,63 ^c	2,25	<0,001	<0,001

Médias dentro de uma linha de tratamentos experimentais sem um sobrescrito comum diferem ($P \leq 0,05$).

¹ CF = Ingrediente de fibra de celulose; ² DPM = Desvio padrão da média

Segundo Mejia; de Francisco e Bohrer (2019) a dureza geralmente é maior quando a formulação inclui maiores níveis de fibra alimentar, porque a imobilização de água e gordura fica aprisionada na rede de fibras e essas interações entre água, proteínas de carne e hidrocolóides/fibras influenciam diretamente a fibra. dureza e elasticidade do sistema de emulsão. Contudo, no presente estudo, este fenômeno de incorporação de fibra alimentar e estabilidade melhorada da emulsão não foi aparente. A fraca estabilidade da emulsão explicou a fraca dureza nas emulsões com 50 % a 100 % de substituição do emulsificante para todos os níveis com CF. Com maior inclusão de CF, todos os atributos de APT foram diretamente afetados e a textura visual geral da emulsão de carne foi afetada negativamente, como exposto na Figura 27.

A elasticidade foi reduzida com maior nível de inclusão do ingrediente CF. Huang et al. (2019) relataram que a elasticidade foi maior com a inclusão de diferentes tipos de farinhas em sistemas de modelagem de emulsão de carne, com a ideia de que mudanças na composição estão envolvidas nessas diferenças. Esta foi provavelmente a resposta as diferenças observadas no presente estudo. A coesividade foi maior no tratamento com 0 % de CF e foi significativamente menor nos outros quatro tratamentos. Isto indicou que qualquer nível de inclusão do ingrediente CF reduziu a coesão do sistema de emulsão; no entanto, uma maior inclusão do ingrediente CF não parece ser mais prejudicial para a coesão.

Figura 27 – Emulsões de carne preparadas usando ingrediente de fibra de celulose (CF). T1 = 100 % CF; T2 = 75 % de CF; T3 = 50 % CF; T4 = 25 % CF e T5 = 0 % CF.



Gomosidade e mastigabilidade ambos foram reduzidos significativamente entre 0 % CF e 25 % CF, indicando o impacto notável que o ingrediente CF tem na textura em níveis de inclusão ainda baixos. No geral, esses dados indicam que é provável que uma pesquisa maior garanta a obtenção de níveis aceitáveis de textura com a incorporação do ingrediente CF; entretanto, a estabilidade da emulsão (água e lipídios perdidos durante o cozimento) provavelmente seja um agente causador das diferenças de textura observadas.

5.4.4 Medições de cor da emulsão modelo

Os parâmetros de cor instrumental (L^* , a^* , b^* , *hue* e *chroma*) de emulsões cozidas e não cozidas são apresentados na Tabela 18. Todos os valores obtidos para as amostras não cozidas e cozidas foram diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos, com exceção dos valores para b^* nas amostras não cozidas. Houve um efeito linear significativo para todos os parâmetros. Em amostras não cozidas, L^* diminuiu, a^* aumentou, b^* diminuiu, o *hue* aumentou e o *chroma* diminuiu à medida que o nível de inclusão do CF foi aumentado. Da mesma forma, em amostras cozidas L^* diminuiu, a^* aumentou, b^* diminuiu, o *hue* aumentou e o *chroma* diminuiu à medida que o nível de inclusão de CF foi aumentado.

Tabela 18 – Cor instrumental de emulsões de carne (cozidas e não cozidas) preparadas com ingrediente de fibra de celulose (CF).

	Tratamento					DPM ²	Tratamento	Efeitos Lineares
	100% CF ¹	75% CF ¹	50% CF ¹	25% CF ¹	0% CF ¹			
Amostras, n	3	3	3	3	3			
Cor das amostras não-cozidas								
L*	63,88 ^c	65,41 ^{bc}	66,47 ^b	66,85 ^b	69,81 ^a	0,40	<0,001	<0,001
a*	9,15 ^a	7,78 ^b	6,91 ^{bc}	6,66 ^c	5,26 ^d	0,22	<0,001	<0,001
b*	12,65 ^a	12,81 ^a	13,17 ^a	13,52 ^a	13,24 ^a	0,22	0,10	0,02
Hue	15,62 ^a	14,99 ^{ab}	14,88 ^{ab}	15,07 ^{ab}	14,25 ^b	0,24	0,03	0,01
Chroma	0,95 ^d	1,03 ^c	1,09 ^b	1,11 ^b	1,19 ^a	0,01	<0,001	<0,001
Cor das amostras após cozimentos								
L*	58,01 ^d	60,19 ^c	62,17 ^{bc}	64,18 ^{a,b}	66,03 ^a	0,47	<0,001	<0,001
a*	14,84 ^a	13,94 ^{ab}	12,54 ^{bc}	11,24 ^c	8,68 ^d	0,32	<0,001	<0,001
b*	10,07 ^c	10,31 ^c	10,62 ^{bc}	11,01 ^b	12,82 ^a	0,15	<0,001	<0,001
Hue	17,94 ^a	17,35 ^{ab}	16,44 ^{bc}	15,73 ^{cd}	14,67 ^d	0,24	<0,001	<0,001
Chroma	0,60 ^d	0,64 ^{cd}	0,70 ^{b,c}	0,78 ^b	0,94 ^a	0,02	<0,001	<0,001

Médias dentro de uma linha de tratamentos experimentais sem um sobrescrito comum diferem ($P \leq 0,05$).

¹ CF = Ingrediente de fibra de celulose; ² DPM = Desvio padrão da média.

As diferenças na cor instrumental foram provavelmente atribuídas às diferenças no nível de inclusão do emulsificante para todos os fins, tanto quanto foram atribuídas às diferenças no nível de inclusão do ingrediente CF. O ingrediente CF era incolor por si só, enquanto o emulsificante em todos os tratamentos continha farinha de trigo e ingredientes lácteos modificados, sendo que ambos relataram anteriormente que provocam diferenças de cor nas emulsões de carne. Huang et al. (2019) relataram que a farinha de trigo causou maior L* e maior b* em emulsões de carne. Barbut (2008) relatou que os ingredientes lácteos modificados causaram variação de L*, a* e b* dependendo de seus componentes da composição geral.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho estudou o uso de celulases comerciais na hidrólise de envoltórios residuais de celulose obtidos a partir do processamento de salsicha, abrindo uma perspectiva para utilização deste resíduo como substrato para obtenção de sacarídeos de menor tamanho molecular (mono e dissacarídeos) bem como de maior tamanho molecular, e sua aplicação como fibra alimentar. No processo de hidrólise enzimática para obtenção de açúcares, foi possível a conversão do envoltório em 85 % da sua totalidade em mono e dissacarídeos (glicose e celobiose). Tais açúcares foram aplicados em bioprocessos para crescimento de bactérias e de microalgas. Já a obtenção de um ingrediente de fibra alimentar, foi possível a obtenção do mesmo e sua caracterização, bem como sua aplicação como substituto de um emulsificante comercial em emulsões modelo de carne bovina.

O envoltório foi caracterizado físico-quimicamente, demonstrando o potencial de sua utilização como carboidrato e possibilidade de aplicação do mesmo na obtenção de açúcares fermentescíveis e/ou como fibra alimentar.

A hidrólise enzimática utilizando os envoltórios residuais de celulose foi realizada liberando no meio líquido glicose e celobiose, com a conversão de 85 % do substrato, e foi confirmada com a diminuição do rendimento pelo o aumento da concentração do substrato, como efeito dos sólidos.

A fim de reduzir mais a celobiose em monômeros de glicose, uma segunda enzima foi adicionada no processo, obtendo-se melhor índice dessa conversão e, por consequente, um incremento no teor de glicose final no hidrolisado.

Foi realizado um aumento de escala dimensional de 16x, mantendo os resultados do processo e fornecendo informações para possível escala industrial. Como demonstrado, os envoltórios residuais de celulose são fontes potenciais de carboidratos para bioprocessos.

Os hidrolisados totais foram aplicados em bioprocessos, sendo substrato para cultivo bacteriológico de *R. eutropha* e de microalgas *C. fusca*, sendo os meios de cultivos testados com teores reduzidos de nitrogênio a fim de produzir polihidroxialcanoatos (PHA).

A bactéria *R. eutropha* foi capaz de consumir a glicose presente no meio de cultivo contendo hidrolisado, porém não consumiu a celobiose também presente. A mesma não produziu o biopolímero PHA.

A microalga *C. fusca* foi capaz de consumir todo o hidrolisado nos cultivos propostos, sob a forma de ambos os sacarídeos (glicose e celobiose), não tendo influência do pH do meio nos diferentes cultivos.

O cultivo de 5 e 10 % de hidrolisado (v:v) obtiveram melhores dados de cinética de crescimento da microalga. A caracterização físico-química da microalga não apresentou diferença significativa para lipídios e proteínas, porém a mesma diferiu nos carboidratos, tendo os cultivos utilizado 5 e 10 % de hidrolisados valores maiores do que o cultivo controle e contendo 1 % de hidrolisado. A microalga *C. fusca* não produziu o biopolímero PHA como esperado nos cultivos contendo hidrolisado.

Foi estudado o uso de envoltórios de celulose residual obtidos a partir da produção de salsicha, abrindo uma perspectiva para utilizar este resíduo como fonte de fibra para aplicação como ingrediente alimentar.

A combinação da hidrólise enzimática com a homogeneização em alta velocidade proporcionou o tratamento na celulose residual, possibilitando a obtenção de um ingrediente de fibra alimentar utilizando uma matéria-prima de baixo custo.

A fibra obtida apresenta características tecnológicas para aplicação como ingrediente alimentar, incrementando o teor de fibra nos produtos finais.

Esta pesquisa estudou a aplicação de um ingrediente de fibra de celulose obtido a partir de envoltórios de salsicha residual em modelos de emulsão de carne, substituindo um emulsificante comercial em diferentes níveis com os envoltórios residuais de salsicha, abrindo uma nova perspectiva para a aplicação em produtos cárneos de um ingrediente de fibra utilizando uma matéria-prima de baixo valor.

Enquanto a aplicação dos diferentes níveis de substituição (de 25 % a 100 %) de um aglomerante comercial mostrou propriedades tecnológicas prejudiciais, esforços futuros de pesquisa poderiam continuar para criar um ingrediente mais funcional e mais adequado para incorporação em produtos cárneos.

É possível concluir que se pode substituir 25 % do aglutinante comercial pelo ingrediente de fibra de celulose sem alterar as propriedades tecnológicas como perda e textura de cozimento, aumentando o teor de fibra nas emulsões de carne e melhorando a cor do produto.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliação do processo enzimático adicionando uma beta-glucosidase como segunda enzima para tentar melhorar a conversão total em glicose.

Avaliação de outras hidrolases de diferentes fungos filamentosos para melhorar a conversão do envoltório de celulose resíduo em açúcares.

Utilização do resíduo de celulose na produção de celulases, utilizando fermentação em estado sólido com fungos.

Aplicações biotecnológicas utilizando o hidrolisado obtido como, por exemplo, aplicação em fungos que não produzem celulases, etc.

Avaliação biológica da fibra alimentar obtida, avaliando características de ligação de glicose, hipocolesterolêmicas, regulação de bile, efeitos probióticos.

Estudar diferentes níveis de substituição da fibra alimentar obtida contra o emulsificante comercial, afim de determinar os melhores percentuais de substituição sem a perda de características tecnológicas de cozimento.

Aplicação da fibra obtida em outras matrizes alimentícias, tais como produtos lácteos, sucos e néctares ou produtos de panificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.

ACOSTA, L. M. F. **Estudo de fontes de carbono orgânicos no cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella vulgaris***. Campinas. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2012.

AGGETT, P. J.; ANTOINE, J.; ASP, N.; BELLISLE, F.; CONTOR, L.; CUMMINGS, J.H.; HOWLETT, J.; MÜLLER, D.J.G.; PERSIN, C.; PIJLS, L.T.J.; RECHKEMMER, G.; TUIJTELAARS, S.; VERHAGEN, H. Passclaim*. **European Journal of Nutrition**, v. 44, n. S1, p. i5–i30, 2005.

AHN, J.; JHO, E. H.; NAM, K. Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. **Environmental Engineering Research**, v. 20, n. 3, p. 246–253, 2015.

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 732–743, 23 abr. 2010.

ALLEN, G. **Sausage: A global history**. London. Reaktion Books, 2015.

ÁLVAREZ, D.; BARBUT, S. Effect of inulin, β -Glucan and their mixtures on emulsion stability, color and textural parameters of cooked meat batters. **Meat Science**, v. 94, n. 3, p. 320–327, 2013.

AMSA. **Meat color measurement guidelines**. Champaign. AMSA. 2012.

AMSA. **Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat**. Champaign. AMSA. 2015.

ANDERSON, J. W.; BAIRD, P.; DAVIS, R.H.; FERRERI, S.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C.L. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 4, p. 188–205, 2009.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.

ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 308–324, 2010a.

ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 280–297, 23 jan. 2010b.

ANNAMALAI, N.; SIVAKUMAR, N. Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 237, p. 13–17, 2016.

ANNAMALAI, N.; SIVAKUMAR, N.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Enhanced production of microbial lipids from waste office paper by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. **Fuel**, v. 217, n. November 2017, p. 420–426, abr. 2018.

AOAC. AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. **Cereal Foods**, p. 7–9, 1995.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg. AOAC International, 2000.

ARAGÃO, G.M.F.; LINDLEY, N.D.; URIBELARREA, J.L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alicagenes eutrophus*. **Biotechnology letters**, v. 18, n. 8, p. 937–942, 1996.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.

ARCHER, B. J.; JOHNSON, S.K.; DEVEREUX, H.M.; BAXTER, A.L. Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 04, p. 591, 9 abr. 2004.

AUFFRET, A.; RALET, M.C.; GUILLON, F.; BARRY, J.L.; THIBAUT, J.F. Effect of Grinding and Experimental Conditions on the Measurement of Hydration Properties of Dietary Fibres. **LWT - Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 166–172, 1 abr. 1994.

AUGUSTO, P. E. D.; IBARZ, A.; CRISTIANINI, M. Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Viscoelastic properties and the Cox-Merz rule. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 1, p. 57–63, 2013.

ÁVILA, M.D.R.; CAMBERO, M.I.; ORDOÑEZ, J.A.; HOZ, L.; HERRERO, A.M. Rheological behaviour of commercial cooked meat products evaluated by tensile test and texture profile analysis (TPA). **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 310–315, 2014.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. [s.l.] McGraw-Hill, 1986.

BAKKER, W.A.M.; HOUBEN, J.H.; KOOLMEES, P.A.; BINDRICH, U.; SPREHE, L. Effect of initial mild curing, with additives, of hog and sheep sausage casings on their microbial quality and mechanical properties after storage at difference temperatures. **Meat Science**, v. 51, n. 2, p. 163–174, 1999.

BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M.J.; LEE, J.H.; BOMMARIUS, A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, nov. 2009.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975009001402>>

BARAMEE, S.; TEERAVIVATTANAKIT, T.; PHITSUWAN, P.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAUKOON, C.; KOSUGI, A.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. A novel GH6 cellobiohydrolase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 and its synergistic action on cellulose degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 1175–1188, 14 fev. 2017.

BARBUT, S. Effect of regular and hydrolysed dairy proteins on texture, microstructure and colour of lean poultry meat batters. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1792–1797, 2008.

BARBUT, S. Sausage casings - microstructure of regular and coated cellulose, fabric and plastic casings. **Italian Journal of Food Science**, v. 23, n. 2, p. 208–213, 2011.

BARBUT, S. **The Science of Poultry and Meat Processing**. Guelph. University of Guelph, 2016.

BELEW, J. B.; BROOKS, J. C.; MCKENNA, D. R.; SAVELL, J. W. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science**, v. 64, n. 4, p. 507–512, 2003.

BENGTSSON, H.; TORNBERG, E. Physicochemical characterization of fruit and vegetable fiber suspensions. I: Effect of homogenization. **Journal of Texture Studies**, v. 42, n. 4, p. 268–280, 2011.

BHARATHIRAJA, B.; CHAKRAVARTHY, M.; KUMAR, R.R.; YOGENDRAN, D.; YUVARAJ, D.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; KUMAR, R.P.; PALANI, S. Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 634–653, 2015.

BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K.C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3425–3431, 2011.

BOMMARIUS, A.S.; KATONA, A.; CHEBEN, S.E.; PATEL, A.S.; RAGAUSKAS, A.J.; KNUDSON, K.; PU, Y. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 370–381, nov. 2008.

BRAGA, V.S.; MOREIRA, J.B.; COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 277, n. November 2018, p. 55–61, 2019.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, ago. 1988.

BURKUS, Z.; TEMELLI, F. Stabilization of emulsions and foams using barley β -glucan. **Food Research International**, v. 33, n. 1, p. 27–33, 2000.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, jul. 2015.

CADDEN, A.; SOSULSKI, F. Composition and physiological properties of several sources of dietary fiber. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1472–1477, 1982.

CAPRITA, A.; CAPRITA, R.; SIMULESCU, V.O.G.; DREHE, R. Dietary Fiber : Chemical and Functional Properties. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 16, n. 4, p. 406–416, 2010.

CARBALLO, J.; COFRADES, S.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Healthier meat and meat products : Their role as functional foods. **Meat Science**, v. 59, p. 5–13, 2001.

CARDOSO, C.; MENDES, R.; NUNES, M. L. Development of a healthy low-fat fish sausage containing dietary fibre. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 2, p. 276–283, 24 jan. 2008.

CASSURIAGA, A.P.A.; FREITAS, B.C.B.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Innovative polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456–463, 2018.

CECCHIN, M.; BENFATTO, S.; GRIGGIO, F.; MORI, A.; CAZZANIGA, S.; VITULO, N.; DELLEDONNE, M.; BALLOTTARI, M. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

CFIA, C. F. I. A. **Labelling requirements for meat and poultry products - Reference information.** Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/food/requirements/labelling/industry/meat-and-poultry-products/eng/1393979114983/1393979162475?chap=22#s37c22>. Acesso em: 22 abr. 2019.

CHAKRABORTY, P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. R. PHA Productivity and Yield of *Ralstonia eutropha* When Intermittently or Continuously Fed a Mixture of Short Chain Fatty Acids . **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1–9, p. 5–38, 2000.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 221–224, 1997.

CHEN, J.; WU, S.; LIANG, R.; LIU, W.; LIU, C.; SHUAI, X.; WANG, Z. The effect of high speed shearing on disaggregation and degradation of pectin from creeping fig seeds. **Food Chemistry**, v. 165, p. 1–8, 15 dez. 2014.

CHOE, J.-H.; KIM, H.; LEE, J.; KIM, Y.; KIM, C. Quality of frankfurter-type sausages with added pig skin and wheat fiber mixture as fat replacers. **Meat Science**, v. 93, n. 4, p. 849–854, abr. 2013.

- CHOI, Y.-S.; CHOI, J.; HAN, D.; KIM, H.; LEE, M.; KIM, H.; JEONG, J.; KIM, C. Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. **Meat Science**, v. 82, n. 2, p. 266–271, jun. 2009.
- COMBRES, C.; LALIBERTÉ, G.; REYSSAC, J.S.; NOÛE, J. Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Physiologia Plantarum**, v. 91, n. 4, p. 729–734, 1994.
- CORTÉS, M.; CHIRALT, A. B.; PUENTE, L. D. Alimentos Funcionales: Una Historia Con Mucho Presente Y Futuro Functional Foods: a History With a Lot of Present and Future. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 12, p. 5–14, 2005.
- COSTA, J. A.V.; COLLA, L.M.; FILHO, P.D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.
- COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2–9, 2011.
- CUMBA, H. J. **Production of value-added products from meat processing cellulose waste**. Oklahoma City. Oklahoma State University, 2005.
- DALPIAN, J. J. **Compostagem de resíduos sólidos contendo gordura e celulose de indústria de produtos cárneos: valoração de resíduos à sub-produto**. Santa Cruz do Sul. Universidade de Santa Cruz do Sul, 2004.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre. Artmed Editora, 2009.
- DE DAMBORENEA, J.; NAVAS, C.; GARCÍA, J.A.; ARENAS, M.A.; CONDE, A. Corrosion–erosion of TiN-PVD coatings in collagen and cellulose meat casing. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 12, p. 5751–5757, mar. 2007.
- DE SOUZA, H.J.B.; FERNANDES, R.V.B.; BORGES, S.V.; FELIX, P.H.C.; VIANA, L.C.; LAGO, A.M.T.; BOTREL, D.A. Utility of blended polymeric formulations containing cellulose nanofibrils for encapsulation and controlled release of sweet orange essential oil. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 6, p. 1188–1198, 2018.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- DESTEFANIS, G.; BRUGIAPAGLIA, A.; BARGE, M. T.; DAL MOLIN, E. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner-Bratzler shear force. **Meat Science**, v. 78, n. 3, p. 153–156, 2008.
- DIETRICH, K.; DUMONT, M.J.; DEL RIO, L.F.; ORSAT, V. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. **New Biotechnology**, v. 49, n. April 2018, p. 161–168, 2019.
- DIKEMAN, C. L.; FAHEY, G. C. Viscosity as related to dietary fiber: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 649–663, 2006.

DJORDJEVIC, J.; PECANAC, B.; TODOROVIC, M.; DOKMANOVIC, M.; GLAMOCLIIJA, N.; TADIC, V.; BALTIC, M.Z. Fermented sausage casings. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 69–72, 2015.

DU, B.; ZHU, F.; XU, B. Physicochemical and antioxidant properties of dietary fibers from Qingke (hull-less barley) flour as affected by ultrafine grinding. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 4, n. 2, p. 170–175, 2014.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E.G.; RADMANN, E.M.; COSTA, J.A.V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472–475, 2017.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, n. x, p. 159–165, 2016.

DUBEY, R.; TOH, Y. R.; YEH, A. I. Enhancing cellulose functionalities by size reduction using media-mill. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

EL KHOURY, D.; CUDA, C.; LUHOVYY, B.L.; ANDERSON, G.H. Beta glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

ELLEUCH, M.; BEDIGIAN, D.; ROISEUX, O.; BESBES, S.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 411–421, jan. 2011.

FEINER, G. **Meat products handbook. Practical science and technology**. Boca Raton. Press, 2006.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SENDRA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 410–417, out. 2008.

FERREIRA, L. F.; ABREU, G.F.; LAGO, A.M.T.; FIGUEIREDO, L.P.; BORÉM, F.M.; MARTINS, M.A.; BORGES, S.V.; DIAS, M.V. Development and application of biopolymer coatings to specialty green coffee beans: Influence on water content, color and sensory quality. **Lwt**, v. 96, p. 274–280, 2018.

FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Conteúdo Lipídico da Biomassa de *Chlorella homosphaera* Cultivada de Modo Heterotrófico sob Diferentes Concentrações de Carbono e Nitrogênio. **Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata**, v. 116, n. 1, p. 19–28, 2017.

FERREIRA, S. P.; HOLZ, J. C. P.; COSTA, J. A. V. Influence on cultivation conditions in the heterotrophic lipid production of the microalga *Chlorella minutissima*. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 1, p. 408–417, 2018.

FIGUEROLA, F.; HURTADO, M.L.; ESTÉVEZ, A.M.; CHIFFELLE, I.; ASENJO, F. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 395–401, 2005.

FLORES, M. Sausages and Comminuted Products: Cooked Sausages. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 722–727, 1 jan. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, F.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Codex alimentarius commission. **Report of the 30th session of the codex committee on nutrition and foods for special dietary uses**, n. November 2008, p. 83, 2009.

FREITAS, B. C. B. DE. **Potencial metabólico de *Chlorella minutissima* e *Chlamydomonas reinhardtii* para o uso em biorrefinarias microalgais**. Rio Grande. Universidade Federal do Rio Grande, 2016.

GAO, D.; CHUNDAWAT, S.P.S.; SETHI, A.; BALAN, V.; GNANAKARAN, S.; DALE, B.E. Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 10922–7, 2013.

GARCIA-GALINDO, I.; GÓMEZ-GARCÍA, R.; PALÁCIOS-PONCE, S.; VENTURA, J.; BOONE, D.; RUIZ, H.A.; SEPÚLVEDA, L.; SABU, A.; AGUILAR-GONZÁLEZ, C.N. New Features and Properties of Microbial Cellulases Required for Bioconversion of Agro-industrial Wastes. In: KUDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. 1st. ed. Oxford, United Kingdom: Academic Press, 2019. p. 535–550.

GARC A, M.; DOMINGUEZ, R.; GALVEZ, M.D.; CASAS, C.; SELGAS, M.D. Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 60, n. 3, p. 227–236, mar. 2002.

GEANKOPLIS, C. J. **Procesos de transporte y operaciones unitarias**. Cidade do México. **CECSA**. 1998.

GENTRY, J.L.; GIGLIOTTI, J.C.; MORITZ, J.S.; TOU, J.C.; JACZYNSKI, J. Spent cellulose casings as potential feed ingredients for ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 663–671, 1996.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1 jan. 1987.

GIDLEY, M. J.; YAKUBOV, G. E. Functional categorisation of dietary fibre in foods: Beyond ‘soluble’ vs ‘insoluble’. **Trends in Food Science and Technology**, 2019.

GIRARD, I.; BRUCE, H.L.; BASARAB, J.A.; LARSEN, I.L.; AALHUS, J.L. Contribution of myofibrillar and connective tissue components to the Warner-Bratzler shear force of cooked beef. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 775–782, 2012.

GRACH, F. C. **Incorporação De Resíduos De Embalagens Pós- Incorporação De Resíduos De Embalagens Pós-**. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GRIGELMO-MIGUEL, N.; ABAD AS-SERÓS, M. I.; MARTÍN-BELLOSO, O. Characterisation of low-fat high-dietary fibre frankfurters. **Meat Science**, v. 52, n. 3, p. 247–256, jul. 1999.

GUILLOIN, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Research International**, v. 33, n. 3–4, p. 233–245, abr. 2000.

HAMAKER, B. R.; TUNCIL, Y. E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 23, p. 3838–3850, 2014.

HAN, J. A.; LIM, S. T. Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI system. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 3, p. 265–272, 2004.

HANNON, M.; GIMPEL, J.; TRAN, M.; RASALA, B.; MAYFIELD, S. Biofuels from algae: challenges and potential Importance & challenges of algal biofuels. **Biofuels**, v. 1, n. 5, p. 763–784, 2010.

HAYES, J. E.; STEPANYAN, V.; ALLEN, P.; O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 164–172, 2011.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007.

HEMUNG, B. O.; BENJAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. PH-dependent characteristics of gel-like emulsion stabilized by threadfin bream sarcoplasmic proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 315–322, 2013.

HENG, K. S.; HATTI-KAUL, R.; ADAM, F.; FUKUI, T.; SUDESH, K. Conversion of rice husks to polyhydroxyalkanoates (PHA) via a three-step process: optimized alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis, and biosynthesis by *Burkholderia cepacia* USM (JCM 15050). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 100–108, 2017.

HEREDIA-ARROYO, T.; TAMARYS; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245–2253, 2011.

HOLMAN, B. W. B.; ALVARENGA, T.I.R.C.; VAN DE VEN, R.J.; HOPKINS, D.L. A comparison of technical replicate (cuts) effect on lamb Warner-Bratzler shear force measurement precision. **Meat Science**, v. 105, p. 93–95, 2015.

HOWLETT, J. **Functional Foods: From science to health and claims**. Bruxelas. ILSI Europe, 2008.

HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921–3926, 2009.

HUA, X.; XU, S.; WANG, M.; CHEN, Y.; YANG, H.; YANG, R. Effects of high-speed homogenization and high-pressure homogenization on structure of tomato residue fibers. **Food Chemistry**, v. 232, p. 443–449, 2017.

HUANG, S.; VASQUEZ-MEJÍA, S.M.; MURCH, S.J.; BOHRER, B.M. Cooking loss, texture properties, and color of comminuted beef prepared with breadfruit () flour. **Meat and Muscle Biology**, v. 3, n. 1, p. 231, 2019.

HUANG, S.; BOHRER, B. M. The Effect of Breadfruit (Artocarpus Altilis) Flour on Textural Properties of Comminuted Beef Compared with Other Flour Sources. **Meat and Muscle Biology™**, v. 2, n. 2, p. 73, 2019.

HUIDOBRO, F. R.; MIGUEL, E.; BLÁZQUEZ, B.; ONEGA, E. A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 527–536, 2005.

IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. **Unit Operations in Food Engineering**. Boca Raton. CRC Press, 2003.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **POF 2008-2009: mais de 90% da população comem poucas frutas, legumes e verduras**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/14059-asi-pof-2008-2009-mais-de-90-da-populacao-comem-poucas-frutas-legumes-e-verduras>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

IGARASHI, K.; UCHIHASHI, T.; KOIVULA, A.; WADA, M.; KIMURA, S.; OKAMOTO, T.; PENTTILA, M.; ANDO, T.; SAMEJIMA, M. Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1279–1282, 2 set. 2011.

IVANOV, V.; STABNIKOV, V.; AHMED, Z.; DOBRENKO, S.; SALIUK, A. Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 725–738, 2014.

JAIN, A.; WEI, Y.; TIETJE, A. Biochemical conversion of sugarcane bagasse into bioproducts. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 227–242, 2016.

JALAK, J.; KURAŠIN, M.; TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 34, p. 28802–28815, 17 ago. 2012.

JOO, S. T.; KIM, G.D.; HWANG, Y.H.; RYU, Y.C. Control of fresh meat quality through

manipulation of muscle fiber characteristics. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 828–836, 2013.

JØRGENSEN, H.; VIBE-PEDERSEN, J.; LARSEN, J.; FELBY, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 862–870, 1 abr. 2007.

KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p. 1058–1066, ago. 2012.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, n. 1, p. 79–86, jan. 2004.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 321–326, 2010.

KESSLER, F. **Fotofuncionalização Superficial de Polímeros: indução de biocompatibilidade e biodegradabilidade**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KIM, H.W.; SETYABRATA, D.; LEE, Y.; KIM, Y.B. Efficacy of Alkali-treated Sugarcane Fiber for Improving Physicochemical and Textural Properties of Meat Emulsions with Different Fat Levels. **Korean journal for food science of animal resources**, v. 38, n. 2, p. 315–324, 2018.

KNIFE, C. L. SAUSAGES, TYPES OF | Cooked. **Encyclopedia of Meat Sciences**, London. Elsevier. 2014.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 1–10, 2009.

KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 51–57, dez. 2016.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F.X.; VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371–380, 2010.

LAMSAL, B. P.; SHRESTA, P.; KHANAL, S. K. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: KHANAL, S. K. et al. (Eds.). **Bioenergy and Biofuel from Biowastes and Biomass**. Reston, Virginia: American Society of Civil Engineers, 2010. p. 505.

LAN, G.; CHEN, H.; CHEN, S.; TIAN, J. Chemical composition and physicochemical properties of dietary fiber from *Polygonatum odoratum* as affected by different processing methods. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 406–410, 1 nov. 2012.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. Porto Alegre. Artmed, 2005.

LENTLE, R. G.; JANSSEN, P. W. M. Manipulating digestion with foods designed to change the physical characteristics of digesta. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 2, p. 130–145, 2010.

LI, C.; UPPAL, M. Canadian diabetes association national nutrition committee clinical update on dietary fibre in diabetes: Food sources to physiological effects. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 34, n. 4, p. 355–361, 2010.

LI, D.; SUN, P.; WANG, Y.; LI, H.; ADHIKARI, B.P. Rheological Behavior of Tomato Fiber Suspensions Produced by High Shear and High Pressure Homogenization and Their Application in Tomato Products. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 204–213, 2014.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043–1049, 2009.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. C, p. 350–382, 1987.

LIER, S.; RIESE, J.; CVETANOSKA, G.; LESNIAK, A.K.; MÜLLER, S.; PAUL, S.; SENGEN, L.; GRÜNEWALD, M. Innovative scaling strategies for a fast development of apparatuses by modular process engineering. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 123, p. 111–125, 2018.

LIM, H. K.; KIM, D.R.; LEE, K.I.; HWANG, D.W.; HWANG, I.T. Complete saccharification of cellulose through chemo-enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 94, p. 31–38, 2016.

LIU, C.M.; LIANG, R.; DAI, T.; YE, J.; ZENG, Z.; LUO, S.; CHEN, J. Effect of dynamic high pressure microfluidization modified insoluble dietary fiber on gelatinization and rheology of rice starch. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 55–61, jun. 2016. LIU, R.; WANG, N.; LI, Q.; ZHANG, M. Comparative studies on physicochemical properties of raw and hydrolyzed oat β -glucan and their application in low-fat meatballs. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 424–431, 2015.

LÓPEZ-MARCOS, M. C.; BAILINA, C.; VIUDA-MARTOS, M.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Properties of Dietary Fibers from Agroindustrial Coproducts as Source for Fiber-Enriched Foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 12, p. 2400–2408, 2015.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos. RiMa, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1 nov. 1951.

LU, M.; LI, J.; HAN, L.; XIAO, W. An aggregated understanding of cellulase adsorption and hydrolysis for ball-milled cellulose. **Bioresource Technology**, v. 273, n. October 2018, p. 1–7, fev. 2019.

LUNN, J.; BUTTRISS, J. L. Carbohydrates and dietary fibre. **Nutrition Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 21–64, mar. 2007.

LUO, X.; WANG, Q.; ZHENG, B.; LIN, L.; CHEN, B.; ZHENG, Y.; XIAO, J. Hydration properties and binding capacities of dietary fibers from bamboo shoot shell and its hypolipidemic effects in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1003–1009, 2017.

LUO, X.; WANG, Q.; FANG, D.; ZHUANG, W.; CHEN, C.; JIANG, W.; ZHENG, Y. Modification of insoluble dietary fibers from bamboo shoot shell: Structural characterization and functional properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1461–1467, 2018.

LYLY, M.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; SUORTTI, T.; AUTIO, K.; POUTANEN, K.; LÄHTEENMÄKI, L. The sensory characteristics and rheological properties of soups containing oat and barley β -glucan before and after freezing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 749–761, 2004.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; ISAK, S. Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 506–577, p. 506–577, 2002.

MA, M.; MU, T. Modification of deoiled cumin dietary fiber with laccase and cellulase under high hydrostatic pressure. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 87–94, 20 jan. 2016.

MACAGNAN, F. T.; DA SILVA, L. P.; HECKTHEUER, L. H. Dietary fibre: The scientific search for an ideal definition and methodology of analysis, and its physiological importance as a carrier of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 85, p. 144–154, jul. 2016.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, fev. 2015.

MAJUMDAR, S.; NAHA, A.; BHATTACHARYYA, D.K.; BHOWAL, J. Effective delignification and decrystallization of cauliflower wastes by using dilute phosphoric acid for efficient enzymatic digestibility to produce fermentable sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 125, n. October 2018, p. 169–179, 2019.

MANDIGO, R. W.; SULLIVAN, G. A. Emulsions and Batters. In: **Encyclopedia of Meat Sciences**. London. Academic Press, 2014.

MAPHOSA, Y.; JIDEANI, V. A. Dietary fiber extraction for human nutrition—A review. **Food**

Reviews International, v. 32, n. 1, p. 98–115, 2016.

MARCHELLO, M.; GARDEN-ROBINSON, J. The art and practice of sausage making. v. 176, n. November, 2017.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLEAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MAROUŠEK, J.; HAŠKOVÁ, S.; ZEMAN, R.; ŽÁK, J.; VAN ČKOVÁ, R.; MAROUŠKOVÁ, A.; VÁCHAL, J.; MYŠKOVÁ, K. Techno-economic assessment of processing the cellulose casings waste. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 17, n. 8, p. 2441–2446, 31 dez. 2015.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574–6, 1966.

MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M.A.; FIGUEROA, J.G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1520–1526, 1 dez. 2012.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1417–1424, 2008.

MCAFEE, A. J.; MCSORLEY, E.M.; CUSKELLY, G.J.; MOSS, B.W.; WALLACE, J.M.W.; BONHAM, M.P.; FEARON, A.M. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. **Meat Science**, v. 84, n. 1, p. 1–13, 2010.

MCCLEMENS, D. J. **Food Emulsions**. Boca Raton. CRC Press, 2016.

MEHTA, N.; AHLAWAT, S.S.; SHARMA, D.P.; DABUR, R.S. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products—a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 633–647, 28 fev. 2015.

MEJIA, S. M. V.; DE FRANCISCO, A.; BARRETO, P.L.M.; DAMIAN, C.; ZIBETTI, A.W.; MAHECHA, H.S.; BOHRER, B.M. Incorporation of β -glucans in meat emulsions through an optimal mixture modeling systems. **Meat Science**, v. 143, n. May, p. 210–218, 2018.

MEJIA, S. M. V.; DE FRANCISCO, A.; SANDRIN, R.; SILVA, T.; BOHRER, B.M. Effects of the incorporation of β -glucans in chicken breast during storage. **Poultry Science**, p. 1–12, 2019a.

MEJIA, S. M. V.; SHAHEEN, A.; ZHOU, Z.; MCNEILL, D.; BOHRER, B.M. The effect of specialty salts on cooking loss, texture properties, and instrumental color of beef emulsion modeling systems. **Meat Science**, v. 156, n. May, p. 85–92, 2019b.

MEJIA, S. M. V.; DE FRANCISCO, A.; BOHRER, B. M. Replacing starch in beef emulsion models with β -glucan, microcrystalline cellulose, or a combination of β -glucan and microcrystalline cellulose. **Meat Science**, v. 153, p. 58–65, 2019.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J.G.C.; BUFFONI, E.; RODRIGUEZ, R.J.S.; SCHRIPSEMA, J.; LOPES, M.S.G.; SILVA, L.F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 815–829, 2014.

MENG-MEI, M.; TAI-HUA, M. Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. **Food Chemistry**, v. 194, p. 237–246, 2016.

MEYABADI, T. F.; DADASHIAN, F. Optimization of enzymatic hydrolysis of waste cotton fibers for nanoparticles production using response surface methodology. **Fibers and Polymers**, v. 13, n. 3, p. 313–321, 3 mar. 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIŠAN, A.; SAKAČ, M.; MEDIC, D.; TADIC, V.; MARKOVIC, G.; GYURA, J.; PAGANO, E.; IZZO, A.A.; BORRELLI, F.; ŠARIC, B.; MILOVANOVIC, I.; MILIC, N. Antioxidant and Physicochemical Properties of Hydrogen Peroxide-Treated Sugar Beet Dietary Fibre. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 5, p. 855–860, 2016.

MIYAMOTO, H.; YAMANE, C.; SEGUCHI, M.; OKAJIMA, K. Comparison between cellulose blend films prepared from aqueous sodium hydroxide solution and edible films of biopolymers with possible application for new food materials. **Food Science and Technology Research**, v. 17, n. 1, p. 21–30, 2010.

MOCZKOWSKA, M.; KARP, S.; NIU, Y.; KUREK, M.A. Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed – A physicochemical approach. **Food Hydrocolloids**, v. 90, n. December 2018, p. 105–112, 2019.

MOHAPATRA, S.; MISHRA, C.; BEHERA, S.S.; THATOI, H. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass? A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 78, n. May, p. 1007–1032, out. 2017.

MONDAL, M.; KHANRA, S.; TIWARI, O.N.; GAYEN, K.; HALDER, G.N. Role of Carbonic Anhydrase on the Way to Biological Carbon Capture through microalgae — A Mini Review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2016.

MONTOYA-ROSALES, J.J.; OLMOS-HERNÁNDEZ, D.K.; PALOMO-BRIONES, R.; MONTIEL-CORONA, V.; MARI, A.G.; RAZO-FLORES, E. Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. **Bioresource Technology**, v. 283, n. January, p. 251–260, 2019.

NAPOLITANO, A.; LANZUISE, S.; RUOCCO, M.; ARLOTTI, G.; RANIERI, R.; KNUTSEN, S.H.; LORITO, M.; FOGLIANO, V. Treatment of cereal products with a tailored preparation of *Trichoderma* enzymes increases the amount of soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7863–7869, 2006.

NAVARRO-GONZÁLEZ, I.; GARCÍA-VALVERDE, V.; GARCÍA-ALONSO, J.; PERIAGO, M.J. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1528–1535, 2011.

NIETO-CALVACHE, J. E.; SORIA, M.; PLA, M.F.E.; GERSCHENSON, L.N. Optimization of the Production of Dietary Fiber Concentrates from By-Products of Papaya (*Carica papaya* L. Var. Formosa) with Microwave Assistance. Evaluation of Its Physicochemical and Functional Characteristics. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 4, 2017.

NILL, J.; KARUNA, N.; JEOH, T. The impact of kinetic parameters on cellulose hydrolysis rates. **Process Biochemistry**, v. 74, n. June, p. 108–117, 2018.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins: State of the Art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–27, 19 mar. 2009.

OH, K.K.; KIM, S.; JEONG, Y.; HONG, S. Bioconversion of cellulose into ethanol by nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 15–30, 2000.

OLMEDILLA-ALONSO, B.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 919–930, 2013.

OSORIO-FIERROS, A.; CRONIN, K.; RING, D.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MORALES-OYERVIDES, L.; MONTAÑEZ, J. C. Influence of granulation process parameters on food tablet properties formulated using natural powders (*Opuntia ficus* and *Chlorella* spp.). **Powder Technology**, v. 317, p. 281–286, 2017.

PAGNANELLI, F.; ALTIMARI, P.; TRABUCCO, F.; TORO, L. Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: Interaction between glucose and nitrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 652–661, 2014.

PARK, S. Y.; YOON, K. Y. Enzymatic production of soluble dietary fiber from the cellulose fraction of Chinese cabbage waste and potential use as a functional food source. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 529–535, 30 abr. 2015.

PEERAJIT, P.; CHIEWCHAN, N.; DEVAHASTIN, S. Effects of pretreatment methods on health-related functional properties of high dietary fibre powder from lime residues. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1891–1898, 2012.

PÉREZ, S.; MAZEAU, K. Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses. In: **Polysaccharides**. Boca Raton. CRC Press, 2005.

PETRACCI, M.; BIANCHI, M.; MUDALAL, S.; CAVANI, C. Functional ingredients for

poultry meat products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 27–39, 2013.

PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 233–247, mar. 2007.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K.; WYMAN, C. E. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 9, p. 846–853, 15 abr. 1993.

PIETRASIK, Z.; JARMOLUK, A. Effect of sodium caseinate and κ -carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 285–294, 2003.

PIÑERO, M. P.; PARRA, K.; HUERTA-LEIDENZ, N.; ARENAS DE MORENO, L.; FERRER, M.; ARAUJO, S.; BARBOZA, Y. Effect of oat's soluble fibre (β -glucan) as a fat replacer on physical, chemical, microbiological and sensory properties of low-fat beef patties. **Meat Science**, v. 80, n. 3, p. 675–680, nov. 2008.

PINHO, L. X.; AFONSO, M.R.A.; CARIOCA, J.O.B.; COSTA, J.M.C.; RAMOS, A.M. The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 941–945, dez. 2011.

PINO, M. S.; RODRÍGUEZ-JASSO, R.M.; MICHELIN, M.; FLORES-GALLEGOS, A.C.; MORALES-RODRIGUEZ, R.; TEIXEIRA, J.A.; RUIZ, H.A. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119–136, 2018.

POUTANEN, K. S.; DUSSORT, P.; ERKNER, A.; FISZMAN, S.; KARNIK, K.; KRISTENSEN, M.; MARSAUX, C.F.M.; MIQUEL-KERGOAT, S.; PENTIKÄINEN, S.P.; PUTZ, P.; SLAVIN, J.L.; STEINERT, R.E.; MELA, D.J. A review of the characteristics of dietary fibers relevant to appetite and energy intake outcomes in human intervention trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. 3, p. 747–754, 2017.

RAJA, R.; COELHO, A.; HEMAISWARYA, S.; KUMAR, P.; CARVALHO, I.S.; ALAGARSAMY, A. Applications of microalgal paste and powder as food and feed: An update using text mining tool. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 740–747, 2018.

RAMAMOORTHY, S. K.; SKRIFVARS, M.; PERSSON, A. A review of natural fibers used in biocomposites: Plant, animal and regenerated cellulose fibers. **Polymer Reviews**, v. 55, n. 1, p. 107–162, 2015.

RAMÍREZ, J. A.; BARRERA, M.; MORALES, O.G.; VÁZQUEZ, M. Effect of xanthan and locust bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 1, p. 11–16, 2002.

RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production,

recent developments and applications. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, n. January 2017, p. 45–56, 2018.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M.M.; LUCKY, R.A.; BASSI, A.S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M.Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79–80, p. 70–77, nov. 2015.

RODRIGUES, R. C. Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxi-butirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos. Florianópolis. UFSC. 2005.

RODRÍGUEZ, R.; JIMÉNEZ, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; GUILLÉN, R.; HEREDIA, A. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 1, p. 3–15, jan. 2006.

RUST, R. E.; KNIPE, C. L. Sausage casings. **Encyclopedia of Meat Sciences**, v. 3, p. 235–240, 2014.

SAINI, J. K.; PATEL, A.K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R.R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, v. 98, p. 29–42, dez. 2016.

SANDERS, D. A.; BELYEA, R. L.; TAYLOR, T. A. Degradation of spent casings with commercial cellulases. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 2, p. 125–131, 2000.

SANGNARK, A.; NOOMHORM, A. Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. **Food Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 221–229, 2003.

SANTALA, O.; KIRAN, A.; SOZER, N.; POUTANEN, K.; NORDLUND, E. Enzymatic modification and particle size reduction of wheat bran improves the mechanical properties and structure of bran-enriched expanded extrudates. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 2, p. 448–456, 2014.

SARTESHNIZI, R. A.; HOSSEINI, H.; BONDARIANZADEH, D.; COLMENERO, F.J.; KHAKSAR, R. Optimization of prebiotic sausage formulation: Effect of using β -glucan and resistant starch by D-optimal mixture design approach. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 704–710, 2015.

SAVIC, Z.; SAVIC, I. **Sausage Casings**. 2nd. ed. Viena: Victus International GmbH, 2016.

SÁYAGO-AYERDI, S. G.; BRENES, A.; GOÑI, I. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 971–976, jun. 2009.

SCHANDA, J. **COLORIMETRY. Understanding the CIE system.** Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons, Inc, 2007.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial - Vol. 2.** São Paulo - SP: Editora Eqdgard Blücher LTDA, 2001.

SCHUH, V.; ALLARD, K.; HERRMANN, K.; GIBIS, M.; KOHLUS, R.; WEISS, J. Impact of carboxymethyl cellulose (CMC) and microcrystalline cellulose (MCC) on functional characteristics of emulsified sausages. **Meat Science**, v. 93, n. 2, p. 240–247, 2013.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SILVEIRA, M.H.L.; AGUIAR, R.S.; SIIKA-AHO, M.; RAMOS, L.P. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 392–396, 2014.

SILVEIRA, M. H. L.; RAU, M.; ANDREAUS, J. Influence of mechanical agitation on the pH profile of total, soluble and insoluble filter paper activity of *Hypocrea jecorina* cellulase preparations. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, n. 1, p. 63–70, 2012.

SILVELLO, M. A. DE C.; MARTÍNEZ, J.; GOLDBECK, R. Increase of reducing sugars release by enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse intensified by ultrasonic treatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 481–489, 2019.

SILVESTRI, S.; GABRIELSON, G. Degradation of tragacanth by high shear and turbulent forces during microfluidization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 163–169, 1991.

SINGH, M.; KUMAR, P.; RAY, S.; KALIA, V.C. Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 235–249, 2015.

SLEGGERS, P. M.; VAN BEVEREN, P.J.M.; WIJFFELS, R.H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A.J.B. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, v. 105, p. 395–406, 2013.

SLUITER, A.; HAMES, B.; SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. NREL/TP-510-42618 - Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. June, 2010.

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Interactions of fungi from fermented sausage with regenerated cellulose casings. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 11, p. 1793–1802, 2011.

SREENATH, H. K.; KOEGEL, R. G. Bioconversion of spent cellulose sausage casings. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 226–232, 2008.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P.K.; GUPTA, V.K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. June 2016, p. 2379–2386, fev. 2018.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

TAHMASEBI, M.; LABBAFI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; YARMAND, M.S. Manufacturing the novel sausages with reduced quantity of meat and fat: The product development, formulation optimization, emulsion stability and textural characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 76–84, 2016.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, jul. 2010.

TERRA, N. Salsichas. In: OLIVO, R. (Ed.). **O Mundo do Frango: Cadeia produtiva da Carne de Frango**. Criciúma, SC: Ed. do Autor, 2006. p. 680.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, v. 70, n. 3 SPEC. ISS., p. 493–508, 2005.

TORNBERG, E. Influence of Fibers and Particle Size Distribution on Food Rheology. In: **Advances in Food Rheology and Its Applications**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. p. 177–208.

TSOUKO, E.; KACHRIMANIDOU, V.; DOS SANTOS, A.F.; LIMA, M.E.N.V.; PAPANIKOLAOU, S.; DE CASTRO, A.M.; FREIRE, D.M.G.; KOUTINAS, A.A. Valorization of By-Products from Palm Oil Mills for the Production of Generic Fermentation Media for Microbial Oil Synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1241–1256, 2017.

VIDOTTI, A. D. S.; FRANCO, L.M.; FRANCO, T.T. Miniaturized culture for heterotrophic microalgae using low cost carbon sources as a tool to isolate fast and economical strains. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 325–330, 2014.

VISCOFAN. **Annual Report**. Disponível em: <http://public.viscofan.com/investor-relations/financialinformation/es/CCAA_2017_completas_con_opiniones_y_revi.SCIIF.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2019.

VISKASE. **Annual Report**. Disponível em: <<http://viskase.com/wp-content/uploads/2018/03/Viskase-Annual-Report-2017.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

WAN, M.; LIU, P.; XIA, J.; ROSENBERG, J.N.; OYLER, G.A.; BETENBAUGH, M.J.; NIE, Z.; QIU, G. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 835–844, 2011.

WANG, J.; SUO, G.; DE WIT, M.; BOOM, R.M.; SCHUTYSER, M.A.I. Dietary fibre enrichment from defatted rice bran by dry fractionation. **Journal of Food Engineering**, v. 186, p. 50–57, 1 out. 2016.

WANG, Y.; SUN, P.; LI, H.; ADHIKARI, B.P.; LI, D. Rheological Behavior of Tomato Fiber Suspensions Produced by High Shear and High Pressure Homogenization and Their Application in Tomato Products. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

WEISS, J.; GIBIS, M.; SCHUH, V.; SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 196–213, 2010.

WEN, Y.; NIU, M.; ZHANG, B.; ZHAO, S.; XIONG, S. Structural characteristics and functional properties of rice bran dietary fiber modified by enzymatic and enzyme-micronization treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 344–351, 2017.

WIKIERA, A.; MIKA, M.; STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A.; STODOLAK, B. Application of Celluclast 1.5L in apple pectin extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 251–257, 2015.

WUTTIPALAKORN, P.; SRICHUMPUANG, W.; CHIEWCHAN, N. Effects of pretreatment and drying on composition and bitterness of high-dietary-fiber powder from lime residues. **Drying Technology**, v. 27, n. 1, p. 133–142, 2009.

XU, H.; JIAO, Q.; YUAN, F.; GAO, Y. In vitro binding capacities and physicochemical properties of soluble fiber prepared by microfluidization pretreatment and cellulase hydrolysis of peach pomace. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 677–684, 2015.

YAN, J.; HU, J.; YANG, R.; ZHAO, W. A new nanofibrillated and hydrophobic grafted dietary fibre derived from bamboo leaves: enhanced physicochemical properties and real adsorption capacity of oil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 10, p. 2394–2404, 2018.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421–449, 9 jul. 2011.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. **Sustainability (Switzerland)**, v. 9, n. 2, p. 1–28, 2017.

YEH, K. L.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. PH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 1–7, 2012.

YOUNG, O. A.; ZHANG, S.X.; FAROUK, M.M.; PODMORE, C. Effects of pH adjustment with phosphates on attributes and functionalities of normal and high pH beef. **Meat Science**, v. 70, n. 1, p. 133–139, 2005.

YOUSSEF, M. K.; BARBUT, S. Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters. **Meat Science**, v. 82, n. 2, p. 228–233, 2009.

YU, G.; BEI, J.; ZHAO, J.; LI, Q.; CHENG, C. Modification of carrot (*Daucus carota* Linn. var. *Sativa* Hoffm.) pomace insoluble dietary fiber with complex enzyme method, ultrafine comminution, and high hydrostatic pressure. **Food Chemistry**, v. 257, p. 333–340, 15 ago. 2018.

YU, X.; LIU, Y.; CUI, Y.; CHENG, Q.; ZHANG, Z.; LU, J.H.; MENG, Q.; TENG, L.; REN, X. Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. S93–S98, jan. 2016.

ZAIN, M. M.; MOHAMMAD, A.W.; HARUN, S.; FAUZI, N.A.; HAIROM, N.H.H. Synergistic effects on process parameters to enhance enzymatic hydrolysis of alkaline oil palm fronds. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. June, p. 617–626, out. 2018.

ZHANG, J.; WANG, Z. W. Soluble dietary fiber from *Canna edulis* Ker by-product and its physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 289–296, 2013.

ZHANG, W.; XIAO, S.; SAMARAWEERA, H.; LEE, E.J.; AHN, D.U. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 15–31, set. 2010.

ZHANG, Y.; LIU, G.; WENG, W.; DING, J.; LIU, S. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly (3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, set. 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHU, L. D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J.J.; YUAN, Z.H.; WANG, Z.M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 1035–1046, 2014.

ZHUANG, X.; JIANG, X.; ZHOU, H.; HAN, M.; LIU, Y.; BAI, Y.; XU, X.L.; ZHOU, G.H. The effect of insoluble dietary fiber on myofibrillar protein emulsion gels: Oil particle size and protein network microstructure. **Lwt**, v. 101, n. September 2018, p. 534–542, 2019.

ZIA-UR-REHMAN, Z.; ISLAM, M.; SHAH, W. . Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables. **Food Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 237–240, 1 fev. 2003.

ANEXOS

Figura A.1 – Esquema analítico para determinação de fibras alimentares solúveis e insolúveis.

