

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos**

**PRODUÇÃO DE PECTINASE DE *Penicillium italicum*
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMI-SÓLIDO.**

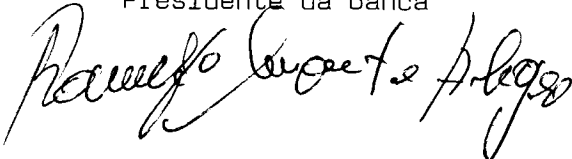
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por PAULO DE TARSO HENNIES e aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de março de 1996.

Campinas, 25 de março de 1996

PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

Presidenta da Banca



Autor: Paulo de Tarso Hennies

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

**Campinas / SP
1996**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	H393p
	27515
	667/96
	X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/04/96
N.º C/PD	

CM-0008711 8-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP


H516p

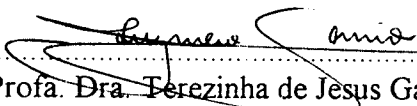
Hennies, Paulo de Tarso
Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de
fermentação em meio semi-sólido / Paulo de Tarso Hennies. --
Campinas, SP: [s.n.], 1996.

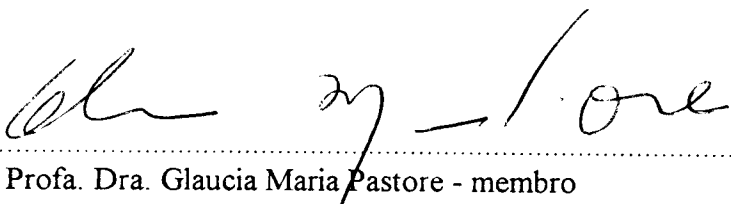
Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I.*Pectinase. 2.Penicillium italicum. 3.Laranja. 4.*Bagaço.
I.Alegre, Ranulfo Monte. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.III.Título.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - orientador


Profa. Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva - membro


Profa. Dra. Glauca Maria Pastore - membro

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral - suplente

Campinas, de de 1996.

Aos meus pais Waldemar e Maria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela dedicação e amizade.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Cutrale, representada pelo Dr. Daniel Stefanelli Marques, pelo apoio através do fornecimento da matéria-prima.

A todos os colegas e amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho. Em especial à Fmi, pelo apoio e incentivo.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Substâncias pécticas.....	3
2.2. Enzimas pectinolíticas.....	7
2.2.1. Ocorrência.....	10
2.2.1.1. Plantas.....	10
2.2.1.2. Microrganismos.....	11
2.2.2. Características.....	11
2.2.2.1. Pectinaesterase (PMGE).....	11
2.2.2.2. Polimetilgalacturonase (PMG).....	13
2.2.2.3. Poligalacturonase (PG).....	14
2.2.2.4. Polimetilgalacturonato liase (PMGL).....	14
2.2.2.5. Poligalacturonato liase (PGL).....	15
2.2.3. Produção.....	15
2.3. Fermentação em meio semi-sólido.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Matéria-prima - bagaço de laranja peletizado.....	22
3.2. Preparo do substrato.....	22
3.2.1. Moagem do bagaço peletizado.....	22
3.2.2. Lavagem e secagem.....	22
3.3. Caracterização do substrato.....	23
3.3.1. Granulometria.....	23
3.3.2. Umidade.....	23
3.3.3. pH do bagaço de laranja.....	23
3.4. Microrganismo.....	23
3.5. Inóculo.....	23
3.5.1. Preparo.....	23
3.5.2. Contagem de esporos.....	24
3.6. Meios de cultura.....	24
3.6.1. Meios de cultura para a fermentação em meio líquido.....	24
3.6.2. Meios de cultura para a fermentação em meio semi-sólido.....	25
3.7. Ensaio de fermentação.....	25
3.7.1. Fermentação em meio líquido.....	25

3.7.2. Fermentação em meio semi-sólido.....	25
3.7.2.1. Estudo da extração da enzima.....	25
3.7.2.2. Efeito da lavagem do bagaço de laranja.....	28
3.7.2.3. Efeito do tempo de fermentação.....	28
3.7.2.4. Triagem das variáveis.....	28
3.7.2.5. Efeito da concentração de sais nutrientes.....	29
3.7.2.6. Efeito da presença e tipo dos açúcares.....	30
3.7.2.7. Efeito do pH sobre a atividade de pectinase.....	30
3.7.2.8. Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinase.....	30
3.7.2.9. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima para a atividade de pectinase.....	30
3.8. Determinação do pH.....	31
3.8.1. pH do meio líquido.....	31
3.8.2. pH do meio semi-sólido.....	31
3.9. Atividade de pectinase.....	31
3.9.1. Atividade de pectinase na fermentação em meio líquido.....	31
3.9.2. Atividade de pectinase nas fermentações em meio semi-sólido.....	32
3.10. Açúcares redutores totais (ART).....	32
3.11 Açúcares redutores (Método de Somogyi-Nelson).....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Caracterização do substrato da fermentação em meio semi-sólido.....	34
4.1.1. Granulometria.....	34
4.1.1.1. Bagaço não lavado.....	34
4.1.1.2. Bagaço lavado.....	34
4.1.2. Umidade.....	35
4.1.3. pH.....	35
4.1.4. Açúcares redutores totais (ART).....	35
4.2. Fermentação em Meio Líquido.....	35
4.3. Fermentação em Meio Semi-Sólido.....	37
4.3.1. Estudo da extração da enzima.....	37
4.3.2. Efeito da lavagem de bagaço de laranja.....	44
4.3.3. Efeito do tempo de fermentação.....	44
4.3.4. Triagem das variáveis.....	46
4.3.5. Efeito da concentração de sais nutrientes.....	47
4.3.6. Efeito da presença e tipo dos açúcares.....	48
4.3.7. Efeito do pH sobre a atividade de pectinase.....	50
4.3.8. Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinase.....	51
4.3.9. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima para a atividade de pectinase.....	52
5. CONCLUSÃO.....	56
6. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ANEXOS.....	62
Anexo A.....	62
Anexo B.....	63
Anexo C.....	64
Anexo D.....	65
Anexo E.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1: Teores de metoxila de algumas pectinas.....	5
TABELA 2.2: Teores de acetil de algumas substâncias pécticas.....	6
TABELA 2.3: Teor de pectina de algumas frutas.....	6
TABELA 2.4: Classificação das enzimas pectinolíticas.....	9
TABELA 2.5: Enzimas pectinolíticas de alguns vegetais.....	10
TABELA 2.6: Enzimas pectinolíticas produzidas por fungos e bactérias.....	12
TABELA 3.1: Composição dos meios de fermentação submersa para produção de pectinase por <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	24
TABELA 3.2: Composição dos meios de fermentação semi-sólidos para produção de pectinase por <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	26
TABELA 3.3: Variáveis do planejamento fatorial (I) e seus níveis quando os tempos empregados foram 1h e 2h para a extração da pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	27
TABELA 3.4: Variáveis do planejamento fatorial (II) e seus níveis quando os tempos empregados foram 2h e 3h para a extração da pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	27
TABELA 3.5: Variáveis do planejamento fatorial (III) e seus níveis quando os tempos empregados foram 3h e 4h para a extração da pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	27
TABELA 3.6: Variáveis do planejamento fatorial (IV) e seus níveis quando os tempos empregados foram 4h e 5h para a extração da pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	28
TABELA 3.7: Fatores e seus níveis utilizados para a triagem das variáveis que afetam a produção de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	29
TABELA 3.8: Condições da fermentação semi-sólida para cada ensaio visando a triagem das variáveis que afetam a produção de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	29
TABELA 4.1: Granulometria do bagaço de laranja não lavado.....	34

TABELA 4.2: Granulometria do bagaço de laranja lavado.....	35
TABELA 4.3: Planejamento fatorial (I) para estudo da extração de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	38
TABELA 4.4: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (I).....	38
TABELA 4.5: Planejamento fatorial (II) para estudo da extração de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	39
TABELA 4.6: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (II).....	40
TABELA 4.7: Planejamento fatorial (III) para estudo da extração de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	40
TABELA 4.8: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (III).....	41
TABELA 4.9: Planejamento fatorial (IV) para estudo da extração de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	41
TABELA 4.10: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (IV).....	42
TABELA 4.11: Variação da atividade enzimática em função da condição empregada para a extração de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	43
TABELA 4.12: Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (IV).....	46
TABELA 4.13: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, produzida por fermentação em meio semi-sólido de bagaço de laranja.....	52
TABELA 4.14: Análise de variância.....	53
TABELA 4.15: Erros associados aos coeficientes da Equação (1).....	54
TABELA E.1: Efeito do tempo de fermentação sobre a produção de pectinase, ART e pH.(Figura 4.1).....	66
TABELA E.2: Efeito do tempo de fermentação sobre a atividade enzimática, a produtividade e o pH do meio de cultura (Figura 4.2).....	66
TABELA E.3: Efeito da concentração de sais nutrientes sobre a atividade de pectinase (Figura 4.3).....	67

TABELA E.4: Efeito da presença e tipo dos açúcares adicionados ao meio de cultura semi-sólido sobre a produção de pectinase por <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584 (Figura 4.4).....	67
TABELA E.5: Variação do pH do meio semi-sólido em função do tempo de fermentação (Figura 4.5).....	67
TABELA E.6: Efeito do pH sobre a atividade de pectinase (Figura 4.6).....	68
TABELA E.7: Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinase (Figura 4.7).....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Estrutura molecular da cadeia principal das substâncias pécnicas.....	4
FIGURA 2.2: Esquema da atuação das pectinases sobre a pectina.....	8
FIGURA 4.1: Efeito do tempo de fermentação sobre ART e pH do meio líquido e sobre a produção de pectinase por <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	37
FIGURA 4.2: Efeito do tempo de fermentação sobre a atividade e a produtividade de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	45
FIGURA 4.3: Efeito da concentração de sais nutrientes sobre a produção de atividade de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja.....	48
FIGURA 4.4: Efeito do tempo de fermentação sobre a produção de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja, para os meios M2, M3 e M4.....	49
FIGURA 4.5: Efeito do tempo sobre o pH dos meios de fermentação M2, M3 e M4 para produção de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.....	49
FIGURA 4.6: Efeito do pH da solução de reação enzimica sobre a atividade de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	50
FIGURA 4.7: Efeito da temperatura de incubação da reação enzimática sobre a atividade de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584.....	51
FIGURA 4.8: Curvas de nível (Equação 2) e pontos experimentais apresentando a atividade de pectinase de <i>Penicillium italicum</i> IZ1584 cultivado em bagaço de laranja, em função da temperatura adimensional (x_2) e do pH adimensional (x_1).....	55

RESUMO

Estudou-se a produção de pectinase por *Penicillium italicum* IZ 1584 através de fermentação semi-sólida de bagaço de laranja industrialmente processado. Primeiramente verificou-se a capacidade do fungo em produzir a enzima em um meio líquido contendo pectina como única fonte de carbono e em outro, contendo também sacarose. Este segundo meio proporcionou a maior atividade de pectinase ($9,31 \times 10^{-2}$ UI/ml) após 96 horas de fermentação. A presença de sacarose no meio de cultivo semi-sólido também demonstrou incrementar a produção de pectinase, obtendo-se atividade de $2,33 \times 10^{-1}$ UI/g MFU após 9 dias de fermentação.

Os sais nutrientes demonstraram ser a variável mais importante para a produção de pectinase na fermentação em meio semi-sólido, quando comparada com as variáveis temperatura de fermentação, concentração de sacarose e pH da solução umidificante. A concentração de sais que proporcionou melhores resultados foi NH_4NO_3 1,20 g / 20 g de bagaço de laranja lavado (BLL), KH_2PO_4 0,08 g / 20 g BLL, e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g / 20 g BLL. Entretanto quando estas concentrações foram duplicadas, obteve-se 96,5% da atividade de pectinase verificada anteriormente, não havendo portanto diferença significativa nos níveis de atividade pectinolítica produzida.

A atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584 obtida por fermentação semi-sólida apresentou pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 45°C, na região de pH ácido.

Palavras-chave: pectinase; *Penicillium italicum*; bagaço; laranja

SUMMARY

Pectinase production by *Penicillium italicum* IZ 1584 was studied in a semi-solid fermentation medium containing processed orange bagasse as substrate. The first step was to verify if the mold was able to release extracellular pectinase in liquid medium containing pectin as the sole carbon source and in liquid medium containing sucrose and pectin as the carbon source. The highest pectinase activity ($9,31 \times 10^{-2}$ UI/ml) was obtained when the second medium was fermented for 96 hours. Sucrose was also added to the semi-solid fermentation medium. Pectinase activity was increased relatively to semi-solid medium without sucrose, with $2,33 \times 10^{-1}$ UI/g MFU after a fermentation period of 9 days.

Nutrient salts, when compared to temperature, sucrose addition and pH (humidifying solution), showed to be the most important variable for pectinase production in the semi-solid process. Best results were obtained with the following concentrations: NH_4NO_3 1,20 g / 20g washed orange bagasse (BLL), KH_2PO_4 0,08g / 20 g BLL, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12g / 20 g BLL. When these concentrations were doubled, 96,5% of the pectinase activity previously observed was verified, showing no significant difference between the salts concentrations on pectinase production.

In the acidic region, pectinolytic activity of *Penicillium italicum* IZ 1584 obtained by semi-solid fermentation showed best activity at pH 5,5 and 45°C.

Key-words: pectinase; *Penicillium italicum*; bagasse; orange.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é hoje uma das áreas de pesquisa mais promissoras em toda a ciência. A fermentação em meio semi-sólido, também denominada de fermentação em estado sólido, por sua vez, é um dos poucos segmentos da biotecnologia onde países em vias de desenvolvimento como o Brasil podem obter resultados significativos. Isto porque este processo fermentativo é ainda pouco compreendido e não necessita de equipamentos sofisticados para ser estudado.

A fermentação em meio semi-sólido é largamente utilizada a nível comercial para a produção de enzimas. O mercado mundial para enzimas de uso industrial é estimado em 625 milhões de dólares, sendo que cerca de 62% das enzimas produzidas são utilizadas por indústrias de alimentos (LEBLOND, 1990). Dentre as aplicações, destacam-se as referentes ao processamento de frutas, onde as principais enzimas envolvidas são as pectinases, celulasas, hemicelulasas, amilases e arabinases, além de naringinase e limoninase.

As principais vantagens da utilização de enzimas pectinolíticas na produção de suco de fruta e vinhos são (SCHWIMMER, 1981; PEPPLER e REED, 1987; GERHARTZ, 1990):

- facilidade de desintegração de maior quantidade de polpa através de meios mecânicos e da sua filtração;
- aumento da quantidade de suco livre, de mosto (vinho) e de suco extraído de resíduos de polpa;
- diminuição da viscosidade;
- diminuição do tempo de processamento em muitos estágios do processamento;
- diminuição do gasto de energia para aquecimento, prensagem e centrifugação;
- compatibilidade com o processo contínuo;
- diminuição das temperaturas de processamento, evitando alterações indesejadas no sabor e na cor devido à caramelização e, em geral, estabilização do suco;
- aumento da remoção de pigmentos e ácidos orgânicos;
- inibição da geleificação do suco concentrado.

Entretanto existem algumas desvantagens potenciais, como o acúmulo de metanol devido à ação da fração pectinaesterase, frequentemente presente nos preparados enzimáticos comerciais. Normalmente a concentração deste álcool fica muito aquém dos limites permitidos para sucos de fruta e vinho, podendo atingir níveis substanciais quando pectinase é empregada no tratamento dos bagaços de maçã e de uva (PEPPLER e REED, 1987).

Outro problema que se pode ter pelo emprego de pectinase é o relativo às alterações de cor nos vinhos, basicamente em vinhos brancos, uma vez que o ácido galacturônico liberado pode favorecer o escurecimento não enzimático (SCHWIMMER, 1981).

Alguns sucos apresentam clarificação espontânea devido à presença de enzimas

pectinolíticas na fruta, como acontece em sucos de frutas cítricas e de tomate. Nos sucos de uva e maçã as pectinases também ocorrem, porém em concentrações mais baixas, sendo necessária a adição de enzimas comerciais durante o processamento industrial (PEPPLER e REED, 1987).

As pectinases, juntamente com outras enzimas, tais como celulasas e hemicelulasas, podem ser utilizadas na maceração enzimática de vegetais durante a produção de néctar de fruta e polpa de fruta ou de vegetais, empregada no preparo de alimentos infantis (PEPPLER e REED, 1987).

A quebra da emulsão de óleo essencial, que se forma na casca de frutas cítricas após a extração do suco, pode ser realizada com a utilização de pectinases. Assim sendo, a quantidade de óleo essencial extraído de cítricos pode ser aumentada (ROMBOUTS e PILNIK, 1978; PLATT e POSTON, 1972).

As enzimas pectinolíticas podem ainda ser aplicadas na indústria têxtil, durante o processamento de fibras naturais de celulose. Neste caso, a degomagem das fibras requer pectinases livres de celulasas. Pesquisas visando esta aplicação vêm sendo desenvolvidas no Brasil em anos recentes (BARACAT et al., 1989 ; BARACAT et al., 1991; BARACAT-PEREIRA et al., 1993).

O Brasil possui um grande potencial para a produção de sucos de frutas, principalmente as tropicais. As enzimas pectinolíticas, usadas desde 1930 nesse processamento, são empregadas principalmente na produção de suco de maçã. Na produção de suco de laranja concentrado congelado, as enzimas pectinolíticas têm sido empregadas para promover uma maior extração do suco retido na polpa e para se reduzir a viscosidade de forma padronizada. Esta padronização se faz necessária devido ao fato das pectinases naturais do fruto apresentarem variações significativas de atividade em função da variedade da laranja empregada e da época de colheita.

Em anos recentes, as pectinases têm sido alvo de pesquisas visando seu emprego na produção de suco de goiaba, de suco de banana, de "blends" ou misturas de sucos (SCHWIMMER, 1981) e de néctar de goiaba (CHAN e CHIANG, 1992), entre outros obtidos de frutos tropicais.

Devido ao crescimento da produção nacional de maçã nos últimos anos, existe a perspectiva do país incrementar a produção de suco desta fruta visando a exportação do concentrado, que é largamente consumido nos Estados Unidos e Alemanha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Substâncias pécticas:

As substâncias pécticas formam um grupo heterogêneo de derivados de carboidratos, ocorrendo em todos os vegetais superiores em quantidades variáveis. Elas são encontradas em tecidos vegetais, nas paredes celulares e na lamela média (espaço intercelular). A principal função biológica destas substâncias é de caráter estrutural. São responsáveis pela união das células umas às outras, além de serem componentes da parede celular primária, juntamente com a celulose e a hemicelulose.

Do ponto de vista químico, as substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos (mais precisamente poliuronídeos), cujo componente principal é um uronídeo derivado da D-galactose, com o grupo hidroxílico do carbono 6 oxidado a carboxílico, denominado ácido D-galacturônico.

Alguns termos têm sido empregados para denominar as diferentes substâncias pécticas, mas as suas definições ainda geram certa confusão. A nomenclatura proposta pela American Chemical Society (KERTESZ, 1951), complementada pela nomenclatura utilizada por WHITAKER (1990), é a seguir apresentada.

“Substâncias pécticas” é a designação global para os derivados coloidais de carboidratos que ocorrem em plantas, ou são preparados a partir destas, e que contém uma grande proporção de unidades de ácido galacturônico anidro. Os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico podem estar parcialmente esterificados por grupos metila, ou parcial ou totalmente neutralizados por uma ou mais bases. As substâncias pécticas são diferenciadas dos polissacarídeos pelo fato de possuírem grupos carboxílicos (COOH), característicos dos ácidos orgânicos. Desta forma, é mais apropriado descrever as substâncias pécticas como sendo derivados de carboidratos ao invés de simplesmente carboidratos (KERTESZ, 1951).

“Protopectina” é a denominação dada para o composto insolúvel em água que ocorre em plantas, a partir do qual se obtém as substâncias pécticas por hidrólise restrita (KERTESZ, 1951). Segundo WHITAKER (1990), a insolubilidade deste composto em água deve-se provavelmente ao tamanho do polímero, ou à ligação com cátions divalentes (especialmente Ca^{+2}) e/ou outros polissacarídeos como celulose e hemicelulose. A protopectina pode ser decomposta através de aquecimento em presença de ácidos diluídos, liberando os ácidos pectínicos e os ácidos pécticos (BOBBIO e BOBBIO, 1985).

“Ácidos pectínicos” designa os ácidos poligalacturônicos coloidais contendo uma quantidade significativa de grupos metil éster. Os ácidos pectínicos são capazes de formar géis com açúcar e ácido, sob condições adequadas. Se o teor de metoxila for baixo, a formação de gel poderá ocorrer quando certos íons metálicos estiverem presentes em solução. Os sais de ácidos pectínicos são pectatos neutros ou ácidos (KERTESZ, 1951). WHITAKER (1990) utiliza uma definição de ácidos pectínicos um

pouco menos genérica, especificando que a quantidade de grupos carboxila metoxilados deve ser maior que zero e menor que 75%.

“Pectina” é o termo geral empregado para designar os ácidos pectínicos com teor de grupos metil éster e grau de neutralização variáveis, solúveis em água, e que são capazes de formar géis com açúcar e ácido sob condições adequadas (KERTESZ, 1951). A pectina é definida por WHITAKER (1990) como sendo o material polimérico solúvel, no qual pelo menos 75% dos grupos carboxílicos das unidades de ácido galacturônico encontram-se esterificados com metanol (Figura 2.1).

“Ácido pécico” este termo é aplicado às substâncias pécicas compostas, em sua maior parte, por ácidos poligalacturônicos coloidais completamente livres de grupos metil éster. Os sais dos ácidos pécicos são pectatos neutros ou ácidos (KERTESZ, 1951; WHITAKER, 1990).

De acordo com KERTESZ (1951), o termo “coloidal” deve ser empregado nas definições acima com a finalidade de excluir quaisquer ácidos poligalacturônicos contendo um número insuficiente de monômeros, uma vez que estes compostos não apresentariam as propriedades coloidais típicas das substâncias pécicas.

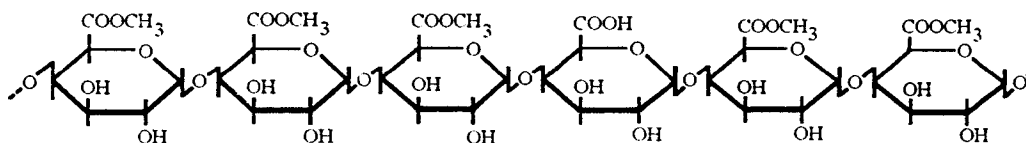


FIGURA 2.1: Estrutura molecular da cadeia principal das substâncias pécicas.

O peso molecular apresentado pelas substâncias pécicas é bastante variável, dependendo da forma como são extraídas dos diversos vegetais. Segundo ROMBOUTS e PILNIK (1978), o peso molecular destas substâncias pode variar desde 30.000 até 300.000. Nas revisões bibliográficas preparadas por WHITAKER (1990) e por FOGARTY e WARD (1974), são apresentados alguns dados de peso molecular das substâncias pécicas condizentes com os limites anteriormente citados, em termos de ordem de grandeza. Em ambas as revisões o menor valor reportado foi 23.000, enquanto o maior peso molecular apresentado foi 360.000.

As substâncias pécicas consistem de uma cadeia principal composta por unidades de ácido D-galacturônico ligadas em α -1,4, com seus grupos carboxílicos parcialmente esterificados com grupos metoxílicos, conforme apresentado na Figura 2.1. O grau de esterificação varia em função do vegetal do qual as substâncias pécicas são extraídas. A pectina de maçã apresenta grau de esterificação entre 80% e 90%, enquanto o grau de esterificação da pectina cítrica situa-se entre 45% e 60%. O teor de metoxila quando os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico encontram-se totalmente esterificados é

16,32%, sendo este valor correspondente a um grau de esterificação de 100%. A Tabela 62.1 a seguir apresenta valores de teor de metoxila das substâncias pécticas de diferentes procedências.

Um pequeno número de unidades de L-ramnopirranose liga-se à cadeia principal das substâncias pécticas, através de seus átomos de carbono C_1 e C_2 . Desta forma, a cadeia principal pode apresentar unidades de L-ramnose (cerca de uma a cada 25 unidades de galacturonato) ligados em β -1,2 e β -1,4 às unidades de ácido D-galacturônico. Cadeias laterais de açúcares neutros, principalmente galactose, arabinose e xilose, estão covalentemente ligadas aos átomos de carbono C_2 e C_3 dos monômeros de ácido D-galacturônico da cadeia principal, ou ao átomo de carbono C_4 das unidades de L-ramnose (ROMBOUTS e PILNIK, 1978; WHITAKER, 1990).

TABELA 2.1: Teores de metoxila de algumas pectinas.

Fonte	Teor de Metoxila (%)
Maçã	10,0 - 11,4
Beterraba	8,3
Laranja	9,4 - 9,6
Morango	0,2

(Fonte: FOGARTY e WARD, 1974 - p. 63)

Em função do vegetal do qual a pectina é extraída, uma certa quantidade dos monômeros de ácido D-galacturônico pode estar acetilada nos átomos de carbono C_2 e C_3 . As propriedades de geleificação das pectinas são afetadas por estes grupos acetílicos. Na Tabela 2.2 são apresentados os teores de acetil para algumas substâncias pécticas.

Conforme FOGARTY e WARD (1974), a molécula de pectina deve ser considerada como um tipo de heteropolissacarídeo, composto por uma cadeia de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações do tipo axial-axial em α -1,4, contendo regiões ricas em L-ramnose, e com galactose, xilose e arabinose como componentes de cadeias laterais secundárias.

A síntese das substâncias pécticas ocorre primariamente durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos vegetais, quando a área das paredes celulares está aumentando. A concentração destas substâncias nas frutas e vegetais varia de acordo com o tipo e a variedade destes, com o grau de maturação, com as práticas agrícolas e com o armazenamento após a colheita. A maioria das frutas, exceto as cítricas, apresenta concentrações de pectina entre 0,5% e 1,0%, conforme a Tabela 2.3 abaixo. A concentração em sucos de frutas é muito menor e altamente variável (FOGARTY e WARD, 1974; PEPLER e REED, 1987).

TABELA 2.2: Teores de acetil de algumas substâncias pécticas.

Fonte	Teor de Acetil (%)
Cereja	0,18
Cítricos	0,24
Morango	1,43
Beterraba açucareira	2,50

(Fonte: FOGARTY e WARD, 1974 - p. 64)

A quantidade e a natureza das substâncias pécticas presentes influenciam significativamente a textura das frutas e vegetais. No caso de frutas verdes (não maduras), a maior parcela das substâncias pécticas está presente na forma de protopectina. Esta é gradualmente transformada em pectina solúvel durante o período de amadurecimento, tornando os frutos menos rígidos (FOGARTY e WARD, 1974).

TABELA 2.3: Teor de pectina de algumas frutas.

Fruta	Pectina (%)
Tomate	0,2 - 0,5
Morango	0,6 - 0,7
Pêssego	0,3 - 1,2
Uva	0,2 - 1,0
Maçã	0,5 - 1,6
Pêra	0,5 - 0,8
Banana	0,7 - 1,2
Limão	3,0 - 4,0
Semente de limão	6,0
Casca de limão	32,0
Polpa de limão	25,0

(Fonte: FOGARTY e WARD, 1974 - p. 67)

As substâncias pécticas são solúveis em água, dimetilsulfóxido e glicerol aquecido, e insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. Substâncias pécticas com cadeias mais longas tendem a ser menos solúveis em água. As soluções aquosas de pectina, com concentrações entre 1% e 2%, são altamente viscosas, sendo esta característica dependente do peso molecular, do grau de esterificação, da força iônica, do pH, da temperatura e da concentração utilizada. Neste caso, as substâncias pécticas podem ser precipitadas através da adição de solventes miscíveis em água (etanol ou

acetona, por exemplo), de polímeros básicos solúveis em água, ou de cátions polivalentes, dependendo do grau de esterificação.

Os materiais pécticos são mais estáveis na faixa de pH 3,0 a pH 4,0, ocorrendo degradação química fora deste intervalo. Na presença de ácidos, as ligações glicosídicas e as ligações éster são hidrolisadas, dependendo da temperatura. Sob temperaturas baixas, prevalece a hidrólise das ligações éster, com pequena degradação do polímero. Por outro lado, a despolimerização é acelerada sob temperaturas mais elevadas. O tratamento com ácidos diminui a quantidade de não uronídeos e, quando conduzido por períodos suficientemente longos, ou quando da utilização de ácidos fortes, ocorre degradação completa. Neste caso são formados dióxido de carbono, furfural e um grande número de outros produtos. Sob condições alcalinas e em baixas temperaturas, as substâncias pécticas podem sofrer saponificação (desesterificação) dos grupos metoxílicos, não ocorrendo despolimerização quando bases diluídas são empregadas. Com a elevação da temperatura, a degradação do polímero acontece rapidamente através de uma reação de trans-eliminação (β -eliminação). Esta reação se dá apenas nas ligações glicosídicas adjacentes a um grupo carboxílico esterificado, o que explica o fato do ácido poligalacturônico ser muito mais estável à degradação alcalina do que as pectinas (FOGARTY e WARD, 1974; MACMILLAN e SHEIMAN, 1974).

2.2. Enzimas pectinolíticas:

As enzimas pectinolíticas são as responsáveis pela degradação das substâncias pécticas, sendo produzidas somente por plantas e microrganismos. O termo “enzimas pectinolíticas”, ou pectinases, normalmente designa as enzimas capazes de degradar os poliuronídeos das moléculas das substâncias pécticas, conforme MACMILLAN e SHEIMAN (1974). Elas estão envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos dos vegetais, e são empregadas a nível industrial desde a primeira metade deste século, destacando-se por serem as enzimas mais utilizadas pelas indústrias de processamento de frutas (PEPLER e REED, 1987; MACMILLAN e SHEIMAN, 1974). As pectinases são aplicadas industrialmente na extração e clarificação de sucos de frutas, na maceração de vegetais e frutas, e na extração de óleos essenciais.

A classificação das enzimas pectinolíticas é feita de acordo com a sua atuação sobre as substâncias pécticas, dividindo-se em dois grupos principais: esterase e despolimerases. A única fração esterase descrita na literatura é denominada pectinaesterase e atua sobre os grupos metil éster, desesterificando a pectina através de um mecanismo de hidrólise. As frações despolimerases atuam sobre a cadeia de poligalacturonato, despolimerizando as substâncias pécticas pela quebra das ligações glicosídicas α -1,4 da cadeia principal. Esta despolimerização pode se dar através de um mecanismo de hidrólise, ou por um mecanismo de transeliminação (β - eliminação). Em função do mecanismo envolvido, as despolimerases são classificadas em hidrolases e liases (ou transeliminases). Elas ainda são subdivididas conforme a especificidade quanto ao substrato preferencial (pectina, ácido péctico ou oligogalacturonato), e segundo o padrão de ação (endo-enzimas e exo-enzimas). A Figura 2.2 apresenta esquematicamente a ação das frações pectinolíticas sobre a cadeia de pectina.

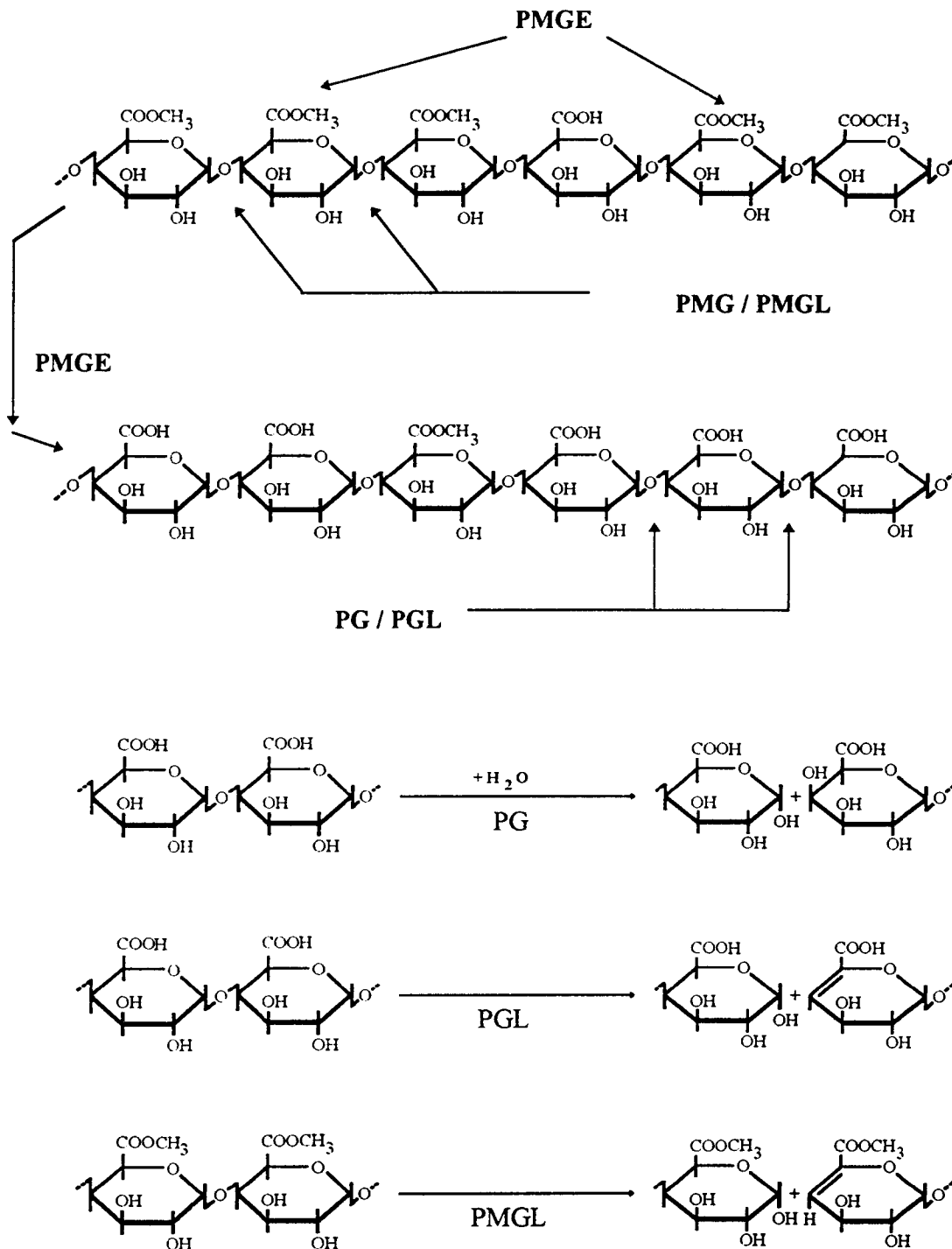


FIGURA 2.2: Esquema da atuação das pectinases sobre a pectina.

A Tabela 2.4 apresenta a classificação das enzimas pectinolíticas de acordo com a nomenclatura proposta pela Comissão de Enzimas da “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC).

TABELA 2.4: Classificação das enzimas pectinolíticas.

Esterase

Pectinaesterase, PMGE, EC3.1.11, desesterifica a pectina a ácido pécico pela remoção dos resíduos de metoxila.

(N.S.): Pectina pectil-hidrolase.

(N.R.): Polimetilgalacturonase esterase.

Despolimerases

1. Com atuação sobre a pectina

1.1. Polimetilgalacturonase (PMG)

a) Endo-PMG hidrolisa a pectina de forma randômica.

(N.S.): Poli(metoxilgalactosiduronato) glicanohidrolase.

(N.R.): Endo-polimetilgalacturonase.

b) Exo-PMG hidrolisa a pectina de modo sequencial.

(N.S.): Poli(metoxilgalactosiduronato) exo-hidrolase.

(N.R.): Exo-polimetilgalacturonase.

1.2. Polimetilgalacturonato liase (PMGL)

a) Endo-PMGL EC4.2.2.10, provoca quebra das ligações glicosídicas através de um processo de transeliminação.

(N.S.): Poli(metoxilgalactosiduronato) endo-liase.

(N.R.): Endo-polimetilgalacturonato liase.

b) Exo-PMGL causa quebra sequencial das ligações glicosídicas através de um processo de transeliminação

(N.S.): Poli(metoxilgalactosiduronato) exo-liase.

(N.R.): Exo-polimetilgalacturonato liase.

2. Com atuação sobre o ácido pécico

2.1. Poligalacturonase (PG)

a) Endo-PG, EC3.2.1.15, hidrolisa o ácido pécico de forma randômica.

(N.S.): Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) glicanohidrolase.

(N.R.): Endo-poligalacturonase.

b) Exo-PG-1, EC3.2.1.67, hidrolisa o ácido pécico produzindo D-galacturonato; ou seja, hidrolisa ligações sucessivas.

(N.S.): Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) galacturonohidrolase.

(N.R.): Exo-poligalacturonase.

c) Exo-PG-2, EC3.2.1.82, hidrolisa o ácido pécico a partir da extremidade não redutora, produzindo digalacturonato; ou seja, hidrolisa ligações alternadas.

(N.S.): Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) digalacturonohidrolase.

(N.R.): Exo-polidigalacturonase.

2.2. Poligalacturonato liase (PGL)

a) Endo-PGL, EC4.2.2.2, provoca quebra das ligações glicosídicas do ácido pécico de forma randômica, por um mecanismo de transeliminação.

(N.S.): Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) endo-liase.

(N.R.): Endo-poligalacturonato liase.

(Continua)

TABELA 2.4: Classificação das enzimas pectinolíticas (continuação).

<p>b) Exo-PGL, EC4.2.2.9, provoca quebra das ligações glicosídicas do ácido péctico de forma sequencial, por um mecanismo de transeliminação. (N.S.): Poli(1,4-α-D-galactosiduronato) exo-liase. (N.R.): Exo-poligalacturonato liase.</p> <p>3. Com atuação sobre oligo-D-galactosiduronato</p> <p>3.1. Oligogalacturonase (OG), hidrolisa oligo-D-galactosiduronato. (N.S.): Oligo-D-galactosiduronato hidrolase. (N.R.): Oligogalacturonase.</p> <p>3.2. Oligogalacturonato liase (OGL), EC4.2.2.6, provoca quebra das ligações glicosídicas do oligo-D-galactosiduronato por um mecanismo de transeliminação. (N.S.): Oligo-D-galactosiduronato liase. (N.R.): Oligogalacturonato liase.</p> <p>(N.R.: Nomenclatura Recomendada ; N.S.: Nomenclatura Sistemática)</p>
--

(Fonte: FOGARTY e KELLY, 1979 - p.61 e 62)

2.2.1. Ocorrência:

2.2.1.1. Plantas:

TABELA 2.5: Enzimas pectinolíticas de alguns vegetais.

Fonte	PMGE	PG
Laranja	+	
Tomate	+	+
Pêra	+	+
Maçã	+	
Alface	+	
Feijão	+	
Pêssego	+	+
Uva	+	+
Abacate		+
Manga	+	
Banana	+	
Papaya	+	
Limão	+	

(Fonte: FOGARTY e WARD, 1974 - p. 84)

As pectinases ocorrem nos tecidos vegetais de diversas plantas, com a função de catalisar as alterações das substâncias pecticas que acontecem durante o crescimento e o desenvolvimento do vegetal. Estas enzimas se concentram particularmente nos frutos e as atividades de pectinaesterase (PMGE) e poligalacturonase (PG) são as mais comumente reportadas na literatura (Tabela 2.5). Os níveis de atividade de pectinase detectados nos vegetais são frequentemente sujeitos às variações sazonais (FOGARTY e WARD, 1974), podendo também apresentar diferenças significativas conforme a variedade de um mesmo fruto (McCREADY, 1977).

2.2.1.2. Microrganismos:

Um grande número de microrganismos é capaz de produzir enzimas pectinolíticas. Tais organismos desempenham um importante papel na biodegradação de matéria vegetal morta, sendo também responsáveis pelo aparecimento de doenças durante a vida das plantas. A produção de pectinases por microrganismos depende basicamente do seu gênero, espécie e linhagem, e das condições disponíveis para seu desenvolvimento (FOGARTY e WARD, 1974).

Na Tabela 2.6 são apresentadas as frações pectinolíticas produzidas por diversos fungos e bactérias. Conforme se observa, a enzima PGL é a fração pectinolítica mais comumente sintetizada pelas bactérias, seguida das frações PG e PMGE. A fração PMG é a única fração pectinolítica não sintetizada pelas bactérias citadas.

As leveduras, na sua maioria, não apresentam qualquer atividade pectinolítica. Com relação aos fungos, a variedade de enzimas pectinolíticas produzidas é maior comparativamente às bactérias. A fração endo-PG é a enzima de maior ocorrência nos fungos. Ao contrário do que se verifica para as bactérias, as frações PMG e PMGL ocorrem com uma razoável frequência para diversos gêneros fúngicos (FOGARTY e WARD, 1974; WHITAKER, 1990).

2.2.2. Características:

2.2.2.1. Pectinaesterase (PMGE):

A atividade de pectinaesterase foi relatada pela primeira vez por Frémy, em 1840. Há vários sinônimos para esta fração pectinolítica, tais como pectina metil esterase, pectina metoxilase e pectina desmetoxilase, sendo o termo pectinaesterase o mais comumente empregado na literatura (WHITAKER, 1990).

A pectinaesterase atua sobre a pectina através de um mecanismo de hidrólise, removendo o grupo metoxílico do grupo carboxílico das unidades de ácido D-galacturônico. Esta reação proporciona a desesterificação da pectina - que eventualmente pode se transformar em ácido pectínico ou ácido pético, dependendo da extensão da hidrólise - e a produção de metanol (WHITAKER, 1990).

TABELA 2.6: Enzimas pectinolíticas produzidas por fungos e bactérias.

Fonte	PG	PMG	PGL	PMGL	PMGE
(Bactérias)					
<i>Bacillus sp.</i>			+		
<i>Bacillus polymyxa</i>			+		
<i>Bacillus subtilis</i>			+		
<i>Pseudomonas sp.</i>			+		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			+		
<i>Pseudomonas marginalis</i>	+		+		+
<i>Xanthomonas sp.</i>			+		+
<i>Xanthomonas campestris</i>			+		+
<i>Erwinia aroidea</i>	+		+		
<i>Erwinia carotovora</i>	+		+		
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>				+	
<i>Clostridium multifermentans</i>			+		+
(Fungos)					
<i>Aspergillus niger</i>	+	+		+	+
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>				+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+		+	
<i>Aspergillus saito</i>	+				
<i>Fusarium oxysporum</i>			+		+
<i>Fusarium solani</i>			+	+	
<i>Penicillium italicum</i>				+	
<i>Penicillium expansum</i>	+				
<i>Penicillium digitatum</i>				+	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+				+
<i>Alternaria brassicae</i>		+	+	+	
<i>Rhizoctonia solani</i>	+			+	+
<i>Sclerotinia fructigena</i>	+			+	+
<i>Byssochlamys fulva</i>	+				
<i>Verticillium nigrescens</i>	+			+	+

(Fonte: FOGARTY e WARD, 1974 - p. 88 e 89; WHITAKER, 1990 - p. 142 e 143)

Segundo WHITAKER (1990), o melhor método para determinação de atividade de pectinase baseia-se na detecção de H^+ liberado a partir da ionização dos novos grupos carboxílicos produzidos pela reação. A quantificação do metanol produzido pode também ser utilizado para a determinação da atividade de pectinaesterase. Esta quantificação pode ser feita diretamente por cromatografia gasosa ou por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os métodos químicos de determinação direta de metanol não são recomendados devido à presença do substrato e de outros produtos de reação. A determinação indireta de metanol pela quantificação dos aldeídos formados na oxidação enzimática do metanol a formaldeído, através da reação com hidroxilamina e Fe^{3+} , é um método bastante sensível, porém de execução trabalhosa.

Nas revisões apresentadas por WHITAKER (1990), MACMILLAN e SHEIMAN (1974) e FOGARTY e WARD (1974) são citados diversos trabalhos relacionando a atividade de pectinaesterase com os possíveis substratos desta enzima. Segundo estas revisões, a especificidade da fração pectinaesterase por poligalacturonatos é quase que absoluta. A ação da pectinaesterase de laranja sobre a pectina é pelo menos 1000 vezes mais rápida do que em ésteres de não-poligalacturonídeos. O grau de polimerização do substrato também é importante, uma vez que a taxa de desesterificação obtida com pectinaesterase de alfafa sobre a pectina é algumas centenas de vezes maior em relação àquela obtida quando metil-D-galacturonato ou metil-D-galacturonato metil glicosídeo é utilizado como substrato. Ainda segundo as referências acima, há indicação de que a reação entre a pectinaesterase e a pectina ocorre de maneira linear ao longo da cadeia do substrato.

O pH ótimo de atividade das pectinaesterases fúngicas é normalmente menor que as pectinaesterases bacterianas e que as pectinaesterases de origem vegetal, situando-se na faixa de pH 3,5 a pH 7,5 (WHITAKER, 1990).

2.2.2.2. Polimetilgalacturonase (PMG):

Esta fração pectinolítica presumivelmente hidrolisa polimetilgalacturonatos a oligometilgalacturonatos, entretanto alguns pesquisadores questionam a existência da enzima polimetilgalacturonase (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974). Segundo WHITAKER (1990), este questionamento se baseia no fato destes pesquisadores nunca terem conseguido demonstrar a presença da fração PMG quando polimetilgalacturonato 100% metilado é usado como substrato, na ausência das frações pectinaesterase (PME) e endo-polimetilgalacturonato liase (endo-PMGL).

Por outro lado, na revisão preparada por FOGARTY e WARD (1974) é reportada a existência de duas frações endo-PMG em um preparado enzimático de *Aspergillus niger*. De acordo com este relato, a primeira fração apresenta pH ótimo igual a 4,0 e hidrolisa pectina altamente esterificada, produzindo desde ácidos galacturônicos até ácidos pentagalacturônicos. A segunda fração, com pH ótimo 7,0, hidrolisa também pectina altamente esterificada, produzindo desde ácidos digalacturônicos até ácidos pentagalacturônicos.

RIOU et al. (1992) descrevem uma fração exo-PMG produzida por *Sclerotinia sclerotiorum*, purificada através de uma série de procedimentos de separação. Esta enzima apresenta peso molecular de 140 kDa, pH ótimo próximo de pH 5,0 e temperatura ótima de 45°C. A atividade de exo-PMG foi inibida por Hg⁺², Zn⁺², Cu⁺² e por p-cloromercuribenzoato, sendo ativada por Mn⁺² e Co⁺². A fração pectinolítica hidrolisou pectina cítrica, não sendo capaz de degradar poligalacturonato de sódio e pectina de maçã, que é altamente esterificada. Os produtos da reação com pectina cítrica foram ácido galacturônico e ácido digalacturônico.

2.2.2.3. Poligalacturonase (PG):

A fração endo-poligalacturonase hidrolisa as ligações glicosídicas internas dos poligalacturonatos de uma forma randômica, produzindo primeiramente uma série de oligogalacturonatos, terminando por produzir ácidos mono e digalacturônicos, dependendo do tempo de digestão. Após cerca de 50% das ligações terem sido degradadas, a velocidade da hidrólise torna-se bastante baixa. O pH ótimo das endo-PG situa-se majoritariamente na região entre pH 4,0 e pH 5,5, sendo dependente do tamanho do substrato (FOGARTY e WARD, 1974). Em geral, o pH ótimo das endo-PG está na região ácida, entre pH 2,5 e pH 6,0.

A endo-PG pode ser obtida a partir de várias plantas e microrganismos, ocorrendo frequentemente em múltiplas formas moleculares. O peso molecular varia de 30 kDa até 85kDa, com ponto isoelétrico de 3,8 a 7,6. Os valores de K_m situam-se entre 0,14 mg/ml e 2,7 mg/ml para o pectato, dependendo da fonte da enzima (WHITAKER, 1990).

A fração exo-PG ocorre em plantas, fungos, bactérias e insetos. O produto final da hidrólise normalmente reportado é o ácido galacturônico, exceto para a exo-PG das bactérias *Erwinia aroidae* e *Pseudomonas* sp., que são capazes de produzir ácido digalacturônico (WHITAKER, 1990). Para a enzima de *Erwinia*, o pH ótimo é 7,2, enquanto o pH ótimo das exo-PG fúngicas normalmente varia entre pH 4,0 e pH 6,0 (FOGARTY e WARD, 1974).

A ação da fração exo-PG sobre o substrato ocorre a partir da extremidade não redutora da cadeia, sendo que uma unidade de galacturonato insaturado presente nesta posição pode bloquear a ação da enzima (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; FOGARTY e WARD, 1974).

2.2.2.4. Polimetilgalacturonato liase (PMGL):

Endo-polimetilgalacturonato liases degradam polimetilgalacturonato de uma forma randômica, produzindo metil oligogalacturonatos insaturados. Pectinas altamente esterificadas são os melhores substratos desta enzima, sendo que os ácidos pécticos não sofrem degradação (WHITAKER, 1990).

A fração endo-PMGL é produzida quase que exclusivamente por fungos, tendo sido demonstrada sua ocorrência em apenas duas linhagens de *Erwinia* e uma de

Pseudomonas. Exo-PMGL ainda não foi descrita em nenhum estudo, não se sabendo se esta fração realmente existe (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

As endo-PMGL apresentam peso molecular por volta de 30 kDa, com ponto isoelétrico variando entre 3,5 e 8,9. O pH ótimo normalmente ocorre em pH ácido, e o K_m para pectina situa-se entre 0,9 mg/ml e 5,0 mg/ml (WHITAKER, 1990).

ALANÑA et al. (1990) estudaram a produção de PMGL extracelular por uma linhagem de *Penicillium italicum*. O seu peso molecular foi determinado como sendo 22 kDa e o ponto isoelétrico determinado em 8,6. O valor do K_m apresentado para pectina com grau de esterificação 70% foi 3,2 mg/ml e o pH ótimo ocorreu entre pH 6,0 e pH 7,0. A enzima apresentou atividade máxima a uma temperatura relativamente elevada (50°C), com completa termoestabilidade entre 30°C e 50°C. A presença de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} não afetou a atividade de PMGL, enquanto os íons Co^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} tiveram efeitos negativos sobre a atividade da enzima.

2.2.2.5. Poligalacturonato liase (PGL):

A fração endo-PGL é produzida somente por microrganismos, basicamente por bactérias e alguns fungos patogênicos. Ela atua sobre o poligalacturonato, produzindo oligogalacturonatos insaturados, sendo os pectatos geralmente bons substratos para esta enzima. O pH ótimo das endo-PGL situa-se na região alcalina, entre pH 8,0 e pH 10,0, bastante elevado frente às outras enzimas pectinolíticas, existindo ainda outra particularidade: estas enzimas requerem Ca^{+2} para ativar a reação enzimática. Devido a este fato, agentes quelantes (EDTA por exemplo) são inibidores destas enzimas. O peso molecular das endo-PGL varia na faixa de 30 kDa a 40 kDa, o ponto isoelétrico normalmente é maior que 9,0 e há uma ampla faixa de valores de K_m para o pectato. A atividade de endo-PGL diminui à medida que o comprimento da cadeia de oligogalacturonato diminui (WHITAKER, 1990).

As exo-PGL ocorrem somente extracelularmente em apenas algumas poucas bactérias, sendo o poligalacturonato seu substrato preferencial. A degradação por esta enzima produz normalmente digalacturonatos insaturados, a partir da extremidade redutora da cadeia do substrato. O pH ótimo desta fração pectinolítica situa-se entre pH 8,0 e pH 9,5. Íons Ca^{+2} também são necessários para ativar as exo-PGL, exceto no caso da enzima das bactérias do gênero *Erwinia*. A degradação de poligalacturonatos e oligogalacturonatos com pelo menos três unidades de ácido galacturônicos ocorre a uma velocidade constante, ao contrário do que acontece com a fração endo-PGL (WHITAKER, 1990; MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

2.2.3. Produção:

Segundo FOGARTY e WARD (1974) e FOGARTY e KELLY (1979), a produção de pectinases em larga escala é feita basicamente por fungos, particularmente do gênero *Aspergillus*. Dentre estes, linhagens de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus wentii* e *Aspergillus flavus* são algumas das mais adequadas. As características das enzimas obtidas a partir destas fontes tornam-nas ideais para o

processamento de frutas, sendo esta sua principal aplicação. Os preparados enzimáticos comerciais de origem fúngica normalmente contém uma mistura de enzimas pectinolíticas. Existem dois métodos para produção de enzimas microbianas: fermentação em meio semi-sólido e fermentação submersa. A seleção do microrganismo capaz de produzir a enzima em níveis adequados é o primeiro passo para a produção de qualquer enzima microbiana comercial. Esta seleção normalmente é resultado da investigação da capacidade de centenas de espécies e linhagens em produzir a enzima desejada. A linhagem selecionada pode sofrer ainda melhoramentos genéticos para atingir níveis de produção mais elevados. A cultura pura do microrganismo é mantida sob condições rigidamente controladas, através de cultura em ágar inclinado e armazenamento como culturas liofilizadas. Exames detalhados da cultura são realizados periodicamente para assegurar que ela está livre de contaminantes, assim garantindo a uniformidade da produção da enzima. Os parâmetros que afetam a síntese da enzima microbiana devem ser estudados para otimizar a sua produção. De um modo geral, entre os fatores mais importantes que influenciam a produção da enzima pode-se citar a espécie (ou linhagem) microbiana, a composição do meio de fermentação, o pH e a temperatura (FOGARTY e WARD, 1974).

Na fermentação em cultura submersa, a determinação de um meio de cultivo balanceado é crítico para a produção de elevadas quantidades de enzima. Desta forma, o meio líquido é preparado por um grande número de componentes: misturas de carboidratos (glicose, melaços, amido, hidrolisado de amido, cereais moídos - como farelo de trigo), materiais nitrogenados (sais de amônia, extratos de levedura, gelatina, caseína), e minerais. Um meio preparado com esses ingredientes é adequado para a produção de diversas enzimas. A maior parte das pectinases comerciais são enzimas indutíveis e substratos com altos teores de pectina, como polpa de beterraba, casca de cítricos e polpa de maçã, devem ser adicionados ao meio de fermentação para que a produção da enzima seja estimulada (FOGARTY e WARD, 1974).

Na fermentação em meio semi-sólido para produção de pectinase, o meio pode ser composto por farelo de trigo e vários outros ingredientes dentre os acima mencionados. Água é adicionada ao meio de forma que o farelo a absorva, juntamente com os demais nutrientes (FOGARTY e WARD, 1974).

Dois sistemas são empregados para a produção de pectinase por cultivo em meio semi-sólido. No primeiro, câmaras fechadas de grandes dimensões são preenchidas com bandejas perfuradas contendo finas camadas de meio de cultivo úmido. No segundo sistema, tambores rotativos horizontais são preenchidos até que metade a dois terços de seu volume esteja ocupado pelo meio. Após a inoculação com uma suspensão de esporos, ar é circulado através dos sistemas. O controle de temperatura é feito com ar frio e sistemas de resfriamento acoplados, no caso das câmaras, enquanto que nos tambores rotativos este controle é feito pela circulação de água sobre a superfície do cilindro. O tempo de fermentação necessário para a produção da enzima varia de um a seis dias em ambos os casos (FOGARTY e KELLY, 1979).

A extração das enzimas pectinolíticas produzidas por fermentação submersa é realizada por filtração ou centrifugação, visando separar a massa celular e demais

componentes insolúveis do meio de cultura. A posterior concentração da enzima não é obrigatoriamente realizada. Quando produzidas por fermentação em meio semi-sólido, as enzimas podem ser extraídas através de um sistema de extração em contra-corrente com água e conservantes. Outra possibilidade, neste caso, seria a secagem do material fermentado a baixas temperaturas. Este material seco pode ser usado como um preparado comercial cru ou pode ser armazenado e a enzima extraída posteriormente (FOGARTY e WARD, 1974).

O extrato enzimático líquido pode ser concentrado a vácuo ou precipitado por sais - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl ou Na_2HPO_4 - ou por solventes orgânicos (isopropanol, acetona, acetato de etila, metanol ou etanol). O precipitado obtido é centrifugado (ou filtrado) e posteriormente seco a baixas temperaturas ou por "spray-drying". Em seguida ele sofre uma moagem para se obter um tamanho de partícula específico, sendo usado na preparação de formulações comerciais da enzima. O material em pó é tanto vendido como um concentrado enzimático com base na sua atividade, como também diluído com diversos agentes (gelatina, caseína, glicose, sacarose, lactose, amido, sais e soluções tampão) para resultar em uma atividade padrão (FOGARTY e WARD, 1974).

GHILDYAL et al. (1981) estudaram a produção em larga escala de enzimas pectinolíticas por fermentação em meio semi-sólido de farelo de trigo. O meio umidificado, colocado em bandejas perfuradas, era inoculado com esporos de *Aspergillus carbanerius* CFTRI 1048. As bandejas eram em seguida colocadas na câmara de um fermentador comercial de superfície, cuja capacidade era de 96 bandejas. O equipamento contava com controles de umidade, temperatura e circulação de ar. As fermentações eram conduzidas por 20 a 21 horas, à temperatura entre 30°C e 35°C e sob umidade relativa de 90%. Quando o controle de temperatura não foi empregado, a temperatura do meio aumentou desde 25°C até 45,2°C devido à geração de calor durante a fermentação, resultando em diminuição de cerca de 12% na produção da enzima. Neste estudo também foram verificados os efeitos da temperatura de extração e do solvente empregado, além do efeito da concentração de etanol e do tempo na precipitação da enzima. Utilizando o material fermentado seco, foram testados os solventes água, água destilada e tampão fosfato 0,1 M, sob temperaturas de 4°C e ambiente (25°C a 28°C). As atividades pectinolíticas obtidas com a extração sob temperatura ambiente foram praticamente as mesmas para todos os solventes. A extração a 4°C com tampão fosfato 0,1 M e água destilada apresentaram uma recuperação de enzima ligeiramente superior às anteriormente citadas. A precipitação da enzima a partir do extrato líquido foi estudada empregando-se diversas concentrações de etanol, em diferentes intervalos de tempo (5 minutos a 6 horas). Houve perda significativa de atividade pectinolítica com o aumento do tempo de contato do etanol com a enzima, concluindo-se que o processo deve ser realizado da forma mais rápida possível. Em termos de concentração de etanol, a concentração ótima de álcool na mistura foi determinado como sendo 50%. A precipitação conduzida a 4°C proporcionou recuperação da enzima 25% maior frente àquela conduzida à temperatura ambiente.

MALDONADO et al. (1986) estudaram a produção de pectinase de linhagens de *Aspergillus* sp obtidas a partir de limões em decomposição. Foram testadas cascas de

limão submetidas a diferentes tratamentos como fonte de carbono em fermentação submersa: casca fresca não lavada; casca fresca lavada; casca fresca não lavada e seca a 100°C (em laboratório); casca fresca lavada e seca a 100°C (em laboratório); e casca totalmente processada na unidade industrial. Os piores resultados foram obtidos quando se utilizou casca de limão seca totalmente processada na indústria. As atividades de poligalacturonase e pectinaesterase verificadas neste caso foram cerca de um terço daquelas obtidas usando-se pectina como fonte de carbono. Quando do emprego dos outros tipos de casca de limão, a atividade de poligalacturonase não se alterou significativamente, sendo aproximadamente 20% maior que aquela obtida com pectina como fonte de carbono. A maior atividade de pectinaesterase foi obtida quando casca de limão fresca, não lavada e seca a 100°C foi utilizada, sugerindo que as substâncias que aumentam a biossíntese desta enzima foram eliminadas pela lavagem.

MAIORANO (1990) estudou a produção de pectinase por cultivo de *Aspergillus* em fermentação semi-sólida em frascos Erlenmeyer de 250 ml. Foram utilizados dois sistemas de fermentação (descontínuo e de corte), empregando-se farelo de trigo como substrato, complementado por uma solução salina. Observou-se que o valor de pH inicial do meio de cultivo que proporcionou a maior produção de pectinase situou-se ao redor de 3,6. Os ensaios em sistemas de cortes foram iniciados com uma fase descontínua. O primeiro deles teve a operação de corte realizada após 20 horas e o segundo após 65 horas de fase descontínua. Foi verificado pelo autor que o instante em que é realizado o corte e a fração de corte têm influência significativa no processo. No caso deste sistema, com fração de corte igual a 75% e quando esta operação foi realizada após 20 horas de fermentação descontínua, obteve-se a máxima atividade de pectinase, que foi 11% maior que o valor obtido com o sistema descontínuo.

FRIEDRICH et al. (1992) estudaram o efeito da fonte de carbono na produção de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* e na produção de biomassa na fermentação em meio submerso. Açúcares simples foram utilizados como única fonte de carbono, sendo os melhores resultados obtidos - para a produção das frações pectinolíticas - com a utilização de sacarose previamente deionizada em uma resina de troca iônica. Entretanto, neste caso, a produção de biomassa foi menor que a obtida com sacarose não deionizada e com pectina. Algumas atividades enzimáticas, como pectinaesterase (PMGE) e pectina liase (PMGL), apresentaram atividades similares às aquelas obtidas quando da utilização de pectina no substrato, mas para a atividade de poligalacturonase (PG) e atividade despectinizante sobre suco de maçã (AJDA), os resultados obtidos com sacarose deionizada foram melhores que os obtidos com pectina.

BARACAT et al. (1991) verificou que a utilização de polpa de laranja como fonte de carbono na fermentação em meio líquido de *Aspergillus fumigatus*, para a produção de atividade de poligalacturonase (PG), forneceu melhores resultados frente aos obtidos tanto com pectina quanto com celulose, amido, lactose, sacarose e glicose. O microrganismo provavelmente apresenta outras frações dentro do seu sistema pectinolítico, uma vez que a atividade de pectinase total (TP) foi sempre superior à atividade da fração PG.

Utilizando os fungos *Aspergillus niger* An-8 , *Rhizopus Rh-3* e *Pleorotus ostreatus*, MENEZES et al. (1989) pesquisaram a produção de proteína microbiana (SCP) para ração animal. A fermentação foi realizada em meio semi-sólido, cujo substrato era bagaço de polpa de laranja - obtido junto à indústria de suco de laranja concentrado, sem prévia neutralização e peletização - complementado com uma solução de sais nutrientes (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Foi verificado que o teor médio de proteína no resíduo atingiu 12% a 15%, o que representou um aumento entre 125% e 300% (base seca), dependendo da espécie utilizada. O fungo *Aspergillus niger* foi considerado o mais efetivo, tendo apresentado uma elevada taxa de crescimento, provavelmente devido ao seu eficiente sistema enzimático. Este sistema apresentou elevadas atividades de glicamilase, celulase e beta-glicosidase. Sabe-se também que esta espécie é uma boa produtora de enzimas pectinolíticas. Por outro lado, o fungo *Pleorotus ostreatus* não foi capaz de converter o substrato em proteína. Segundo os autores, este fungo teria capacidade de atuar sobre o substrato devido ao fato de possuir sistema enzimático degradante de celulose, xilano e hemicelulose. Provavelmente o óleo essencial da casca de laranja remanescente no bagaço foi a causa da inibição do desenvolvimento do microrganismo.

2.3. Fermentação em meio semi-sólido:

GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES (1992) definem as fermentações em meio sólido como sendo aquelas onde o "substrato é um material úmido, não suspenso em água e sem escorrimento aquoso, que permite o desenvolvimento de fermentação empregando um ou mais microrganismos". O teor de umidade do substrato deve variar entre 12% até cerca de 80%. Abaixo do limite mínimo, os microrganismos não se desenvolvem. O limite superior é fixado em função da capacidade de absorção de água pelo material empregado (ORJOL et al., 1988). Entretanto água em excesso irá diminuir a porosidade e a difusão do oxigênio no material, além de aumentar o risco de contaminação bacteriana. O material úmido pode atuar simplesmente como um suporte ou como substrato.

Dentre os resíduos celulósicos de origem agroindustrial susceptíveis de serem empregados como substrato, destacam-se a polpa de café, palhas e casca de frutas processadas. Esses materiais podem ser objeto de pré-tratamentos físicos e químicos, cuja finalidade é melhorar as características relacionadas com a porosidade do substrato, sua capacidade de retenção de água e nutrientes solúveis, e a capacidade das partículas em se manterem livres, sem formação de grumos, visando uma maior transferência de massa através do substrato. A fermentação em meio absorvido, na qual o material sólido é utilizado primordialmente como suporte para o substrato, é apresentada pelos autores como sendo uma possível variação da fermentação em meio semi-sólido. Como exemplo, GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES (1992) citam um estudo realizado por eles cujo objetivo era produzir enzimas pectinolíticas. Neste trabalho, bagaço de cana pré-tratado é utilizado como suporte, absorvendo o substrato (sacarose e glicose) e o indutor da síntese enzimática (pectina).

Quanto aos microrganismos que podem ser empregados, GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES (1992) apresentam os fungos filamentosos como sendo os mais

apropriados a esse tipo de fermentação. Os fungos apresentam maior versatilidade (grande variedade de produtos específicos que podem ser obtidos), são fáceis de manejar, não são patogênicos, crescem a baixo pH (menor possibilidade de contaminação bacteriana), esporulam facilmente e as quantidades obtidas dos produtos específicos são razoáveis. Os pesquisadores apresentam as principais vantagens da fermentação em meio semi-sólido frente à submersa, como menor requerimento de energia, obtenção de produtos concentrados (que facilitam a extração), menor produção de efluentes, condições não estéreis e baixo consumo de água. Todas estas vantagens são importantes e devem ser levadas em conta não só pelo aspecto econômico, mas também pelo aspecto ambiental, pois a fermentação em meio semi-sólido, de um modo geral, tem menor impacto sobre o meio ambiente. As desvantagens desse tipo de fermentação são o difícil controle do processo, os problemas relativos à transferência de massa e os poucos conhecimentos técnicos, fisiológicos e bioquímicos.

Os biorreatores para a fermentação em meio semi-sólido são descritos em mais detalhes por PANDEY (1991), inclusive quanto aos aspectos econômicos envolvidos. Os fermentadores de bandejas são os mais simples, e as bandejas podem ser metálicas (alumínio ou ferro), de plásticas ou mesmo de madeira. No caso de bandejas de ferro, estas devem ser pintadas para se evitar corrosão. Elas são perfuradas de forma a conter o substrato e permitir que haja aeração na superfície inferior do meio de cultivo. Normalmente as bandejas são arranjadas dentro da câmara umas sobre as outras, com uma distância adequada entre elas. Os fermentadores de bandeja são caracterizados como sendo de alto custo, pois necessitam de uma grande área operacional e o substrato não pode ser esterilizado no fermentador. Além disso, o manuseio das bandejas é dificultado no caso daquelas com grandes dimensões.

Nos fermentadores de tambor rotativo, o crescimento microbiano é considerado como sendo melhor e mais uniforme relativamente aos fermentadores de bandeja, e a mistura do substrato é normalmente feita a baixas velocidades de rotação. Quando esta é realizada em velocidades elevadas, pode ocorrer danos ao micélio. Em alguns processos contínuos de compostagem, os tambores de grandes dimensões posicionados ligeiramente inclinados e a rotação contínua proporcionam um excelente efeito (PANDEY, 1991).

Os fermentadores de coluna consistem basicamente de uma coluna de vidro ou plástico com tampas nas duas extremidades, podendo ter uma jaqueta acoplada externamente com circulação de água para o controle da temperatura. Este controle pode ser também pela imersão das colunas em um banho termostático. Os fermentadores de coluna são empregados basicamente em estudos de laboratório (PANDEY 1991)

O autor acima cita ainda outros sistemas de fermentação menos utilizados, como o desenvolvido por CUERO et al.(1985) para estudos em escala de laboratório, onde o meio de fermentação é acondicionado em sacos plásticos produzidos a partir de um filme especial de polipropileno. Este material apresenta microporos menores que 0,4 μm , os quais permitem uma eficiente transmissão de ar e vapor d'água sem comprometimento da esterilidade do conteúdo interno.

Os aspectos econômicos da fermentação em meio semi-sólido e da fermentação submersa devem levar em conta alguns fatores, tais como a concentração do produto nos meios de fermentação, o custo do processo de separação e purificação, o custo do processamento dos efluentes, e as características do produto. Baseado nestes aspectos e em outras características de diversos processos onde a fermentação em meio semi-sólida é empregada, PANDEY (1991) conclui que os sistemas de fermentação em meio semi-sólido podem ser economicamente vantajosos em relação à fermentação submersa em alguns casos. Entretanto, os recentes desenvolvimentos têm permitido um controle dinâmico do processo em fermentações em meio líquido, empregando o monitoramento por computador, enquanto na fermentação em meio semi-sólido o controle de processo é ainda bastante incipiente.

HESSELTINE (1972) descreve as características das fermentações em meio semi-sólido quando o sistema é agitado. Segundo este autor, o substrato sólido deve permitir a livre circulação de ar, não se formando agregados do material durante a fermentação. Desta forma, a umidade do substrato deve ser mantida em níveis baixos, ao redor de 28%. Para que a aeração não seja comprometida, o volume de substrato relativamente à capacidade volumétrica do reator não deve ser grande.

Dentre as principais vantagens desse processo fermentativo, destacam-se as seguintes: emprego de um único ingrediente, adicionado quando necessário de outros nutrientes; pequeno espaço ocupado pelo equipamento, uma vez que a quantidade de água é pequena; não necessidade de tanques para a produção de inóculo, uma vez que os esporos são usados diretamente; inexistência de problemas relativos à contaminação bacteriana, devido à baixa umidade do meio de cultivo; as condições de crescimento do fungo são mais parecidas àquelas encontradas no seu habitat natural; diminuição significativa da esporulação do fungo devido à agitação (ao contrário do que acontece na cultura em bandejas), diminuindo a possibilidade de contaminação da área de fermentação e, se for patogênico, diminuindo as chances de infecção dos manipuladores; normalmente maiores taxas de produção são obtidas em relação à fermentação submersa; e extração do produto desejado a partir do próprio biorreator, pela adição direta do solvente (HESSELTINE, 1972).

As principais desvantagens da fermentação em meio semi-sólido em sistema agitado referem-se ao maior consumo de energia, à grande quantidade de esporos necessários para o inóculo, aos pré-tratamentos que os substratos normalmente devem sofrer, e à necessidade de muito trabalho de desenvolvimento para que o processo possa ter sua escala ampliada com sucesso. Finalmente, os maiores problemas relacionados à utilização de substratos sólidos são: a necessidade de se produzir o inóculo em grandes quantidades, com esporos com capacidade de germinação rápida e uniforme, acima de 95%; a determinação da quantidade ótima de inóculo para cada fermentação; os níveis de umidade do meio semi-sólido devem ser determinados para cada espécie fúngica empregada; e requerimento de considerável desenvolvimento na parte de engenharia, incluindo a relação entre a quantidade ótima de substrato e a forma e dimensão do fermentador (HESSELTINE, 1972).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima - bagaço de laranja peletizado:

O bagaço de laranja peletizado foi obtido junto à indústria Cutrale (unidade de Olímpia/SP), tendo sido produzido a partir do processamento de laranjas das variedades Pera (60,4%), Natal (32,1%) e Valência (7,5%), colhidas no período de entressafra, nos dias 15 e 16 de abril de 1994. O rendimento em suco foi de 62% e a relação Brix:acidez ("ratio") foi de 11,42.

Após a extração do suco de laranja nas extratoras FMC, o bagaço, à temperatura ambiente e com umidade entre 80% e 82%, foi transportado através de um sistema de rosca sem fim até o tanque de neutralização. Adicionou-se cal (CaO) na proporção de 0,07 kg por caixa (40 kg) de laranja processada. Ao final deste processo, o bagaço de laranja atingiu pH entre 7,0 e 7,5. Em seguida o bagaço de laranja neutralizado foi submetido à prensagem, tendo sua umidade reduzida para cerca de 62% a 65%.

O bagaço prensado foi conduzido até a unidade de secagem, onde ar quente era admitido à temperatura de 780°C. Ao deixar o equipamento, o ar úmido apresentava temperatura de 120°C e o bagaço de laranja teve sua umidade diminuída para 9%. Parte do licor obtido na prensagem foi adicionado ao bagaço de laranja seco anteriormente à peletização para se atingir valores de umidade entre 10% e 12% no pelete.

3.2. Preparo do substrato:

3.2.1. Moagem do bagaço peletizado:

Anteriormente à sua utilização, o material peletizado foi desintegrado em moinho de faca (Máquinas Renard / MFC-180-75-01; acionamento por motor de 1 CV; peneira número 1 - abertura de 1,9 mm).

3.2.2. Lavagem e secagem:

A lavagem do bagaço moído foi realizada em um tanque de aço inox de aproximadamente 40 litros de capacidade. O bagaço foi colocado no tanque até ocupar cerca de um quarto da sua capacidade, e em seguida completou-se o volume com água. Após alguns minutos, a água foi retirada pela saída inferior do tanque, que dispunha de uma tela metálica para reter o material sólido. Este procedimento foi repetido sucessivamente até que se obtivesse um teor de açúcares redutores totais (ART) inferior a 1% no bagaço seco. O bagaço foi posteriormente seco em secador de bandejas, sob temperatura máxima de 60°C.

3.3. Caracterização do substrato:

3.3.1. Granulometria:

A análise granulométrica do bagaço de laranja moído foi realizada em agitador de peneiras tipo magnético, marca Bertel, máquina número 319, série 8703, com escala variável de agitação (0 a 10).

Foram realizadas 3 repetições para o bagaço não lavado, utilizando-se 4 peneiras marca Granutest: ABNT 12 (Tyler 10), ABNT 16 (Tyler 14), ABNT 25 (Tyler 24) e ABNT 70 (Tyler 65). A posição da escala de agitação empregada foi a máxima (10), e o experimento foi realizado por um período de 30 minutos.

Para o bagaço lavado adotou-se o mesmo procedimento. Neste caso, entretanto, apenas uma repetição foi realizada, uma vez que todo o material lavado foi analisado.

3.3.2. Umidade:

A umidade do bagaço de laranja foi determinada a partir da medida da diferença de massa entre a amostra úmida e a seca. A secagem foi realizada sob temperatura de 105°C em estufa aerada, com as amostras acondicionadas em frascos previamente tarados. Após 24 horas de secagem, os frascos foram colocados em dissecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida pesados em balança analítica da marca Sartorius Analytic, modelo A200S.

3.3.3. pH do bagaço de laranja:

Foi preparada uma suspensão do bagaço de laranja em água destilada, na proporção 1:10 (massa:volume). Após agitação a 150 rpm por 30 minutos em mesa rotativa, fez-se a determinação do pH da suspensão em potenciômetro da marca Analyser, modelo pH 300.

3.4. Microrganismo:

O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, obtido junto ao Instituto Zimotécnico, ESALQ, Piracicaba, SP. Sua manutenção foi realizada através de repiques quinzenais sucessivos em tubos de ensaio contendo meio ágar-batata-dextrose inclinado, os quais eram incubados a 28°C após a inoculação.

3.5. Inóculo:

3.5.1. Preparo:

O inóculo para a fermentação em meio líquido foi preparado pela adição de água destilada estéril aos tubos de ensaio contendo a cultura pura do fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, desenvolvida por 7 dias a 28°C em meio batata-dextrose-ágar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida pela raspagem do ágar com alça metálica,

seguida de agitação manual. A fermentação foi iniciada pela adição de uma alíquota da suspensão de esporos ao meio de cultura submersa.

Para a fermentação em meio semi-sólido, o inóculo foi preparado de forma idêntica àquela acima descrita, exceto pelo fato da cultura ter sido desenvolvida em frascos Erlenmeyer ao invés de tubos de ensaio. A fermentação foi iniciada pela adição de uma alíquota da suspensão de esporos em cada embalagem contendo o meio de cultivo. Esta foi novamente selada, homogeneizada manualmente e incubada a 28°C em estufa com circulação de ar (exceto onde especificada outra temperatura).

3.5.2. Contagem de esporos:

A contagem de esporos foi realizada através de microscópio óptico, em duplicatas, utilizando-se câmara de Neubauer.

3.6. Meios de cultura:

3.6.1. Meios de cultura para a fermentação em meio líquido:

Os meios de cultivo para a fermentação submersa descritos na Tabela 3.1 foram definidos a partir dos meios empregados por ALAÑA et al. (1989), ALAÑA et al. (1990) e BRUMANO et al. (1993).

TABELA 3.1: Composição dos meios de fermentação submersa para produção de pectinase por *Penicillium italicum* IZ 1584.

Componente	Meios de Fermentação	
	Meio A	Meio B
KH ₂ PO ₄	2,00 g/l	2,00 g/l
FeSO ₄	0,01 g/l	0,01 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,10 g/l	1,10 g/l
KCl	0,50 g/l	0,50 g/l
NaNO ₃	2,00 g/l	2,00 g/l
Pectina cítrica (p. a.)	10,00 g/l	10,00 g/l
Sacarose (p. a.)	-	30,00 g/l

Frascos Erlenmeyer de 250 ml receberam 50 ml do meio líquido, sendo em seguida fechados com tampão de algodão e gaze e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foram preparados 4 frascos contendo o Meio A e outros 4 frascos contendo o Meio B.

3.6.2. Meios de cultura para a fermentação em meio semi-sólido:

Os meios de cultivo para a fermentação em meio semi-sólido são apresentados na Tabela 3.2. Eles foram definidos a partir do meio de fermentação utilizado por MENEZES et al. (1989).

O bagaço de laranja foi acondicionado em embalagem de polipropileno de dimensões 20,0 cm x 30,2 cm e em seguida adicionaram-se os sais e a sacarose em solução aquosa. A umidade final do substrato foi fixada em 75%. A embalagem contendo o meio de cultivo foi selada, homogeneizada manualmente e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.7. Ensaio de fermentação:

3.7.1. Fermentação em meio líquido:

A fermentação foi iniciada pela adição de 1 ml da suspensão de esporos ($1,906 \times 10^5$ esporos/ml) em cada frasco, resultando em uma concentração de $3,812 \times 10^3$ esporos/ml de meio de fermentação. Ela foi conduzida a 29°C sob agitação de 150 rpm em mesa rotativa da marca Rotary Shaker - Fermentation Design Inc., modelo 0531.

Uma amostra do caldo de fermentação de cada meio de cultura foi retirada em intervalos de tempo de 48 horas, sendo que uma alíquota foi empregada para determinação do pH e o restante da amostra foi centrifugada a 5000 rpm (3.357 g). O sobrenadante obtido na centrifugação foi analisado quanto ao teor de açúcares redutores totais (ART), sendo também empregado como extrato enzimático bruto na determinação da atividade de pectinase.

3.7.2. Fermentação em meio semi-sólido:

3.7.2.1. Estudo da extração da enzima:

Neste experimento foi empregado o meio M1, descrito na Tabela 3.2 (item 3.6.2). Cada embalagem contendo o meio semi-sólido foi inoculada com $1,031 \cdot 10^6$ esporos/ g de bagaço seco e a fermentação foi conduzida sob temperatura de 28°C.

O material fermentado foi retirado das embalagens após 6 dias de fermentação e distribuído sobre uma tela de nylon, sendo novamente colocado na estufa a 28°C. A fermentação prosseguiu até que o meio de cultivo tivesse sua umidade suficientemente reduzida (15% - base úmida), o que foi obtido após 44 horas e 30 minutos. Com este nível de umidade considerou-se que a fermentação estava interrompida.

O material fermentado seco foi homogeneizado manualmente e amostras de 4,0 g foram retiradas para se fazer a extração da enzima.

TABELA 3.2: Composição dos meios de fermentação semi-sólidos para produção de pectinase por *Penicillium italicum* IZ 1584.

Componente	Meio de Fermentação							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Bagaço de laranja lavado	-	20,00 g	17,95 g	20,00 g	-	20,00 g	20,00 g	20,00 g
Bagaço de laranja não lavado	40,00 g	-	2,05 g	-	20,00 g	-	-	-
NH ₄ NO ₃	2,40 g	1,20 g	1,20 g	1,20 g	1,20 g	0,60 g	2,40 g	3,60 g
KH ₂ PO ₄	0,16 g	0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,04 g	0,16 g	0,24 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,24 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,06 g	0,24 g	0,36 g
Sacarose (p.a.)	-	-	-	0,56 g	-	-	-	-

As variáveis solvente (água destilada e solução 0,1% de Tween 80), diluição do material fermentado, condição de agitação e tempo de extração foram estudadas em dois níveis.

Foram realizados quatro planejamentos fatoriais, sendo a única diferença entre eles os níveis utilizados para o tempo de extração. Variou-se o tempo entre 1 hora e 5 horas, avaliando-se os efeitos para cada intervalo de uma hora. As condições de extração para cada planejamento fatorial completo são apresentadas nas Tabelas 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6. Ao final do período de extração, os materiais suspensos foram separados da fase líquida por filtração através de papel de filtro Whatman número 1.

TABELA 3.3: Variáveis do planejamento fatorial (I) e seus níveis quando os tempos empregados foram 1h e 2h para a extração da pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584:

Fator	Variável	Nível -	Nível +
(1)	Solvente	Sol. Tween 80	Água dest.
(2)	Agitação (rpm)	0	200
(3)	Diluição (m:v)	1:20	1:10
(4)	Tempo (horas)	1	2

TABELA 3.4: Variáveis do planejamento fatorial (II) e seus níveis quando os tempos empregados foram 2h e 3h para a extração da pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584:

Fator	Variável	Nível -	Nível +
(1)	Solvente	Sol. Tween 80	Água dest.
(2)	Agitação (rpm)	0	200
(3)	Diluição (m:v)	1:20	1:10
(4)	Tempo (horas)	2	3

TABELA 3.5: Variáveis do planejamento fatorial (III) e seus níveis quando os tempos empregados foram 3h e 4h para a extração da pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584:

Fator	Variável	Nível -	Nível +
(1)	Solvente	Sol. Tween 80	Água dest.
(2)	Agitação (rpm)	0	200
(3)	Diluição (m:v)	1:20	1:10
(4)	Tempo (horas)	3	4

TABELA 3.6: Variáveis do planejamento fatorial (IV) e seus níveis quando os tempos empregados foram 4h e 5h para a extração da pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584:

Fator	Variável	Nível -	Nível +
(1)	Solvente	Sol. Tween 80	Água dest.
(2)	Agitação (rpm)	0	200
(3)	Diluição (m:v)	1:20	1:10
(4)	Tempo (horas)	4	5

3.7.2.2. Efeito da lavagem do bagaço de laranja:

Dois meios de cultura foram utilizados para o estudo do efeito da lavagem do bagaço de laranja. Suas composições eram as especificadas para os meios M2 e M5 na Tabela 3.2 (item 3.6.2), sendo o pH das soluções umidificantes ajustado para pH 5,0. Os meios de fermentação foram inoculados com $2,058 \times 10^7$ esporos / g de bagaço seco cada um e a fermentação foi conduzida sob temperatura de 34°C em estufa com circulação de ar, por 7 dias.

A extração da enzima pectinase foi realizada pela suspensão de 20 gramas do material fermentado (úmido) em solução 0,1% de Tween 80, na razão 1:5 (massa:volume), sendo conduzida sem agitação e sob temperatura ambiente durante 3 horas. Ao final deste período, os materiais suspensos eram separados da fase aquosa por filtração através de papel de filtro Whatman número 1.

3.7.2.3. Efeito do tempo de fermentação:

Empregou-se o Meio M2 (Tabela 3.2 - item 3.6.2), que foi inoculado com $4,078 \times 10^6$ esporos / g bagaço seco, e a fermentação conduzida à temperatura de 28°C. As amostras foram retiradas diariamente até o sétimo dia de fermentação e a extração da enzima realizada como descrito no item 3.7.2.2, fazendo-se a suspensão na razão de 1:10 (massa:volume). O material fermentado úmido (MFU) apresentou umidade de 75% (base úmida).

3.7.2.4. Triagem das variáveis:

Neste experimento empregou-se bagaço de laranja lavado (20,0 g / embalagem), sendo as condições de fermentação com respeito às variáveis temperatura de fermentação, adição dos sais NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, adição de sacarose e pH da solução umidificante para cada ensaio definidas a partir de um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} de resolução IV. Os níveis empregados de cada variável (ou fator) são apresentados na Tabela 3.7. Os sais e a sacarose, quando presentes no meio de fermentação, apresentavam as concentrações especificadas para o meio M4 (Tabela 3.2 - item 3.6.2). As condições de fermentação para cada ensaio são apresentadas na Tabela 3.8.

TABELA 3.7: Fatores e seus níveis utilizados para a triagem das variáveis que afetam a produção de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584.

FATORES	NÍVEL -	NÍVEL +
(1) Temperatura	28 °C	34 °C
(2) Sais	ausência	presença
(3) Sacarose	ausência	presença
(4) pH da sol. umidificante	3,0	5,0

A fermentação foi iniciada pela inoculação de $7,711 \times 10^6$ esporos / g bagaço seco em cada embalagem contendo o meio de fermentação semi-sólido, e desenvolvida por 7 dias para todos os ensaios realizados. A extração da enzima foi realizada conforme o item 3.7.2.2.

TABELA 3.8: Condições da fermentação semi-sólida para cada ensaio visando a triagem das variáveis que afetam a produção de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584.

Ensaio	Níveis dos Fatores			
	1	2	3	4
1	+	+	+	+
2	-	+	+	-
3	+	-	+	-
4	-	-	+	+
5	+	+	-	-
6	-	+	-	+
7	+	-	-	+
8	-	-	-	-

3.7.2.5. Efeito da concentração de sais nutrientes:

Foram preparados quatro meios de fermentação, diferenciados pelas concentrações dos sais NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, descritos pelos meios M6, M2, M7 e M8 na Tabela 3.2 (item 3.6.2). A solução umidificante teve seu pH ajustado para pH 5,0. Os meios de fermentação foram inoculados com $2,085 \times 10^7$ esporos/ g de bagaço seco e a fermentação conduzida à temperatura de 34°C por 7 dias. A extração foi realizada conforme descrito no item 3.7.2.2.

3.7.2.6. Efeito da presença e tipo dos açúcares:

Foram empregados os meios M2, M3 e M4 descritos no item 3.6.2.1 (Tabela 3.2), sendo que cada embalagem contendo o meio semi-sólido foi inoculada com $3,129 \times 10^6$ esporos / g bagaço seco. Os meios M3 e M4 foram definidos de forma que a concentração de açúcares em ambos ficasse na faixa de 2,8% a 3,0% (massa:massa). A fermentação foi conduzida a 28°C em estufa com circulação de ar. As amostras foram retiradas após períodos de 6, 7, 8, 9, 10 e 15 dias de fermentação e a extração da enzima realizada conforme descrito no item 3.7.2.2, fazendo-se a suspensão na razão de 1:10 (massa:volume)

3.7.2.7. Efeito do pH sobre a atividade de pectinase:

Foram realizadas fermentações sob diferentes condições de pH da solução umidificante, concentração de sacarose, concentração de sais nutrientes e de temperatura definidas no experimento triagem de variáveis, onde as duas condições de temperatura eram 28°C e 32°C (Ensaio C). Este material foi inoculado com $2,508 \times 10^6$ esporos / g de bagaço seco, fermentado durante 5 dias e estocado sob refrigeração durante 9 dias, sendo resultante da primeira tentativa de se fazer o experimento da triagem de variáveis. Anteriormente às análises, os materiais eram retirados das embalagens e homogeneizados manualmente. A extração foi realizada conforme descrito no item 3.7.2.2, fazendo-se a suspensão na razão de 1:10 (massa:volume).

O meio de fermentação empregado no Ensaio D foi idêntico ao Meio M2 (Tabela 3.2 - item 3.6.2). O material foi inoculado com $2,085 \times 10^7$ esporos / g de bagaço seco e a fermentação foi conduzida à temperatura de 34°C por 7 dias. As análises foram realizadas ao final deste período. A extração foi realizada como descrito no item 3.7.2.2.

3.7.2.8. Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinase:

O material utilizado neste experimento, bem como todos os procedimentos, foram exatamente os mesmos do item anterior (3.7.2.5), somente se diferenciando pelo fato daquele empregado para o Ensaio C ter permanecido 14 dias estocado sob refrigeração.

3.7.2.9. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima para a atividade de pectinase:

A determinação das condições ótimas de temperatura e pH para a atividade de pectinase foi realizada apenas na região de pH ácido. Empregou-se o meio M2 (Tabela 3.2 - item 3.6.2.1), o qual foi inoculado com $2,058 \times 10^7$ esporos / g de bagaço seco. A fermentação foi conduzida à temperatura de 34°C por 7 dias e a extração foi realizada como descrito no item 3.7.2.2.

3.8. Determinação do pH

3.8.1. pH do meio líquido:

Uma alíquota do meio de fermentação teve seu pH determinado diretamente em potenciômetro da marca Analyser, modelo pH 300.

3.8.2. pH do meio semi-sólido:

Uma alíquota da suspensão do extrato enzimático bruto não filtrado teve seu pH determinado diretamente em potenciômetro da marca Analyser, modelo pH 300, conforme item 3.3.3.

3.9. Atividade de pectinase:

A atividade de pectinase foi determinada pela quantificação dos grupos redutores produzidos na reação entre o extrato enzimático bruto, solução tampão e solução 1,0% de pectina cítrica p.a.. A reação foi iniciada pela adição do substrato, sendo conduzida em banho-maria à temperatura constante. Após o período de incubação, a reação foi interrompida através da inativação da enzima por aquecimento das amostras em banho-maria em ebulição por 10 minutos.

O branco e o controle foram preparados de forma semelhante à descrição acima, substituindo-se o extrato enzimático bruto respectivamente por água destilada e pelo extrato enzimático bruto previamente inativado em banho-maria em ebulição por 10 minutos.

A quantificação dos grupos redutores, expressos como ácido galacturônico, foi realizada pelo método de Somogyi-Nelson como descrito no item 3.11.

A atividade de pectinase foi calculada pela diferença de concentração dos grupos redutores presentes nas amostras e nos respectivos controles. Uma unidade internacional de atividade (UI) foi definida como μmol de ácido galacturônico produzido por minuto. Para a fermentação em meio líquido, a atividade de pectinase foi expressa em UI por 1 ml da solução de reação (UI / ml). Para a fermentação em meio semi-sólido a atividade enzimática foi expressa em UI por grama de material fermentado úmido (UI / g MFU), exceto no experimento “estudo da extração da enzima”, onde ela foi expressa como UI por grama de material fermentado seco (UI / g MFS).

3.9.1. Atividade de pectinase na fermentação em meio líquido:

A mistura de reação para determinação da atividade de pectinase foi composta por 1,0 ml do extrato enzimático bruto, 2,0 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 6,0 e 1,0 ml de solução 1,0% de pectina cítrica. A reação enzimática foi realizada sob temperatura de 40^oC durante 30 minutos.

3.9.2. Atividade de pectinase nas fermentações em meio semi-sólido:

No estudo da extração da enzima, a mistura de reação para determinação da atividade de pectinase foi composta por 1,0 ml do extrato enzimático bruto, 2,0 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 e 1,0 ml de solução 1,0% de pectina cítrica. A reação enzimática foi realizada sob temperatura de 40°C durante 60 minutos.

Nos estudos do efeito do tempo de fermentação e do efeito da presença e tipo dos açúcares, os volumes dos componentes e a temperatura de incubação foram idênticos àqueles especificados para o estudo da extração da enzima, sendo empregado tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,0. A reação enzimática foi conduzida por 30 minutos.

Nos estudos do efeito da lavagem do bagaço, do efeito da concentração de sais nutrientes e na triagem de variáveis, a mistura de reação para determinação da atividade de pectinase foi composta por 1,0 ml do extrato enzimático bruto, 1,0 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0 e 1,0 ml de solução 1,0% de pectina cítrica. A reação enzimática foi realizada sob temperatura de 45°C durante 30 minutos.

Nos estudos dos efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade de pectinase, a mistura de reação foi composta por 1,0 ml do extrato enzimático bruto, 1,0 ml de solução 1,0% de pectina e 1,0 ml do tampão. Os tampões empregados nos Ensaios C e D (Efeito do pH) foram citrato-fosfato 0,1 M para os valores de pH 3,0 a pH 7,0, e borato 0,1 M para valores de pH entre 8,0 e 9,0. No caso do estudo do efeito da temperatura, empregou-se tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 para o Ensaio C e pH 5,5 para o Ensaio D. A temperatura de incubação foi de 45°C para os Ensaios C e D do estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática. O tempo de incubação foi de 45 minutos para o Ensaio C do estudo do efeito do pH, e 30 minutos para os demais.

Na determinação do pH ótimo e da temperatura ótima para atividade de pectinase, a mistura de reação foi composta por 1,0 ml do extrato enzimático bruto, 1,0 ml de solução 1,0% de pectina e 1,0 ml do tampão citrato-fosfato 0,1M. O tempo de incubação foi 30 minutos.

3.10. Açúcares redutores totais (ART):

Para a análise de ART do meio líquido, tomou-se uma alíquota de 5,0 ml do sobrenadante e adicionou-se 0,5 ml de solução aquosa de ácido clorídrico 17%. A solução resultante foi aquecida em banho-maria a 70°C por 15 minutos. Ao término deste período, a solução foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente, sendo em seguida neutralizada com solução de hidróxido de sódio 10%. Os açúcares redutores foram quantificados na solução neutralizada através do método de Somogyi-Nelson, como descrito no item 3.11.

No caso do bagaço não fermentado e do material proveniente de fermentação em meio semi-sólido, uma amostra de 5,0 g de foi suspensa em 80 ml de água destilada, em frasco Erlenmeyer de 250 ml. Esta suspensão foi submetida à agitação de 250 rpm por

15 minutos em agitador e em seguida filtrada em papel de filtro Whatman número 1. Com o filtrado obtido determinou-se o teor de ART como descrito anteriormente.

3.11. Açúcares redutores (método de Somogyi-Nelson):

Este método empregou duas soluções distintas. A primeira, denominada de Reagente de Somogyi-Nelson I foi preparada pela dissolução de 4,0 g de sulfato de cobre (CuSO_4), 24,0 g de Na_2CO_3 anidro, 16,0 g de NaHCO_3 , 12,0 g de tartarato de sódio e potássio e 18,0 g de Na_2SO_4 , nesta ordem, em 600 ml de água destilada. O volume foi completado para 1,0 litro em balão volumétrico e a solução obtida deixada em repouso por uma noite em ambiente escuro. Após este período, filtrou-se a solução através de papel de filtro Whatman número 1 e estocou-se o reagente em frasco escuro, protegido da luz. A segunda solução, denominada de Reagente de Somogyi-Nelson II, foi preparada a partir de duas outras soluções. A primeira foi obtida pela dissolução de 50,0 g de molibdato de amônio anidro em 900 ml de água destilada, seguida da adição de 42,0 ml de ácido sulfúrico concentrado. A outra solução foi preparada pela dissolução de 6,0 g de Na_2HAsO_4 anidro em 50 ml de água destilada. O Reagente de Somogyi-Nelson II foi preparado através da mistura destas duas soluções. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C , estocou-se o reagente em frasco escuro, protegido da luz.

O procedimento para a determinação de açúcares redutores foi iniciado pela adição de 2,0 ml de Reagente de Somogyi-Nelson I a um tubo contendo 1,0 ml da amostra. Após agitação manual, a mistura obtida era incubada em banho em ebulição por 6 minutos e os tubos, ao final deste período, foram resfriados em banho de gelo. Adicionaram-se 2,0 ml de Reagente de Somogyi-Nelson II, seguido de agitação manual vigorosa e repouso durante 5 minutos, sob temperatura ambiente. Um volume de 20 ml de água destilada foi adicionado e os tubos agitados por inversão. A absorbância a 540 nm foi lida em espectrofotômetro da marca Analyser, modelo 800, relativamente ao tubo branco. O valor obtido foi utilizado no cálculo da concentração de açúcares redutores presentes na amostra, a partir de uma curva padrão relacionando a concentração de ácido galacturônico ou glicose com a absorbância (SOMOGYI, 1952).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do substrato da fermentação em meio semi-sólido:

4.1.1. Granulometria:

4.1.1.1. Bagaço não lavado:

Os dados do perfil granulométrico do bagaço não lavado, realizado conforme especificado no item 3.3.1, são apresentados na Tabela 4.1. Os resultados mostram que cerca de 86,0% do material apresenta granulometria igual ou inferior a 0,71 mm (peneira ABNT 25).

TABELA 4.1: Granulometria do bagaço de laranja não lavado.

Peneira (ABNT)	Abertura (mm)	Massa de Bagaço Retido (%)				Erro (%)
		(1)	(2)	(3)	Média	
12	1,68	0,07	0,09	0,10	0,09	0,02
16	1,19	13,44	14,18	14,16	13,93	0,42
25	0,71	42,85	45,25	44,27	44,12	1,21
70	0,21	31,93	30,18	31,00	31,03	0,84
fundo	-	11,71	10,30	10,47	10,83	0,77
total	-	100,00	100,00	100,00	100,00	-

4.1.1.2. Bagaço lavado:

O resultado obtido para o perfil granulométrico para o bagaço lavado (item 3.3.1) é apresentado na Tabela 4.2.

Os dados mostram que cerca de 57,5% do material apresenta granulometria igual ou inferior a 0,71 mm. Comparando-se com os resultados do bagaço não lavado, percebe-se uma diminuição significativa da quantidade de finos. Este fato é decorrente basicamente de dois fatores. O primeiro é a formação de grumos durante a secagem do material lavado e o segundo é a perda de finos durante a lavagem.

TABELA 4.2: Granulometria do bagaço de laranja lavado.

Peneira (ABNT)	Abertura (mm)	Massa de Bagaço Retido	
		(g)	(%)
12	1,68	103,48	9,56
16	1,19	356,39	32,93
25	0,71	392,96	36,30
70	0,21	205,42	18,98
fundo	-	24,12	2,23
total	-	1082,37	100,00

4.1.2. Umidade:

Os bagaços não lavado e lavado apresentaram umidades de 13,0% e 8,1%, respectivamente (item 3.3.2).

4.1.3. pH:

Foram realizadas três determinações de pH com os bagaços lavado e não lavado . O pH médio obtido para o bagaço lavado foi 5,04. O bagaço não lavado apresentou pH 4,52 , ligeiramente inferior em relação ao bagaço lavado. Este fato pode ser justificado pelo fato da água de lavagem ter retirado uma parcela das substâncias ácidas presentes inicialmente no bagaço não lavado.

4.1.4. Açúcares redutores totais (ART):

O bagaço de laranja não lavado apresentou um teor de açúcares redutores totais (ART) de 25,5%, enquanto o teor de ART no material lavado foi de 0,42 %.

4.2. Fermentação em meio líquido:

A Figura 4.1 (Tabela E1 - Anexo E) mostra os resultados de produção de pectinase, teor de ART e pH do meio líquido. As atividades de pectinase das amostras do Meio B (com sacarose) foram sempre superiores àquelas do Meio A (sem sacarose - item 3.6.1). Após 48 horas de fermentação, a atividade de pectinase no Meio B foi cerca de 100 vezes maior que a atividade no Meio A. Essa diferença foi da ordem de 10 vezes às 96 horas de fermentação, caindo para aproximadamente 2 vezes após 144 horas de fermentação. Estes resultados indicam que o microrganismo produz atividade de pectinase extracelularmente, sendo esta atividade influenciada positivamente pela presença de sacarose no meio de fermentação. A capacidade deste carboidrato em

induzir a produção de atividades pectinolíticas foi reportada por outros pesquisadores (FRIEDRICH et al., 1992), quando o fungo *Aspergillus niger* foi empregado. A produção de atividade pectinolítica no Meio A indica que esta é induzida pela presença do substrato, uma vez que a pectina é o único carboidrato presente no meio de fermentação. Nos estudos de ALAÑA et al. (1989), há indicação de que a fração pectina liase (PMGL) da linhagem de *Penicillium italicum* pesquisada foi induzida pela presença de pectina no meio de cultura, sendo que na sua ausência a atividade de PMGL detectada foi desprezível. Portanto, a indução pela pectina pode também ter ocorrido no Meio B. Neste caso, a presença de sacarose, um carboidrato mais simples de ser metabolizado pelo fungo, favoreceu a produção da enzima em quantidades mais elevadas.

A produção de pectinase no Meio B atinge um ponto de máximo antes de se completarem 144 horas de fermentação, enquanto a produção no Meio A, embora bastante inferior, é sempre crescente no período de tempo estudado.

O pH de ambos os meios se alterou no decorrer da fermentação, aumentando em cerca de uma unidade após 144 horas quando se utiliza o Meio B. Para o Meio A este aumento foi de cerca de 2,60 unidades após o mesmo período. No primeiro caso não parece existir qualquer relação entre a produção de pectinase com o pH do meio. Por outro lado, no Meio A percebe-se que a atividade pectinolítica é incrementada à medida que o pH aumenta.

Em relação ao teor de ART no Meio B, verifica-se que este passa por um ponto de máximo durante as primeiras 96 horas, diminuindo significativamente ao final de 144 horas de fermentação, enquanto que no Meio A esta variação é muito menor, com concentrações de ART sempre pequenas e crescentes à medida que a fermentação vai acontecendo.

Em ambos os casos parece haver uma relação da atividade de pectinase com o teor de ART no meio líquido. Esta relação sugere que quando se atinge um determinado teor de ART no decorrer da fermentação, a produção de pectinase é de alguma forma inibida. Os açúcares solúveis disponíveis no caldo de cultura continuariam sendo metabolizados pelo fungo, o que condiz com a diminuição da concentração de ART na fase final da fermentação do Meio B. No Meio A, o nível de ART é baixo em todo o período analisado, verificando-se que o fungo produz continuamente atividade pectinolítica. Esta é capaz de hidrolisar a única fonte de carbono disponível para o desenvolvimento do fungo - a pectina.

A máxima atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584 obtida com o meio líquido ($9,31 \times 10^{-2}$ UI/ml) foi cerca de 70% da máxima atividade de pectinase de *Aspergillus fumigatus* obtida por BARACAT et al. (1991), ressalvando-se que as metodologias de quantificação dos açúcares redutores e preparação e condução da reação enzimática foram diferentes.

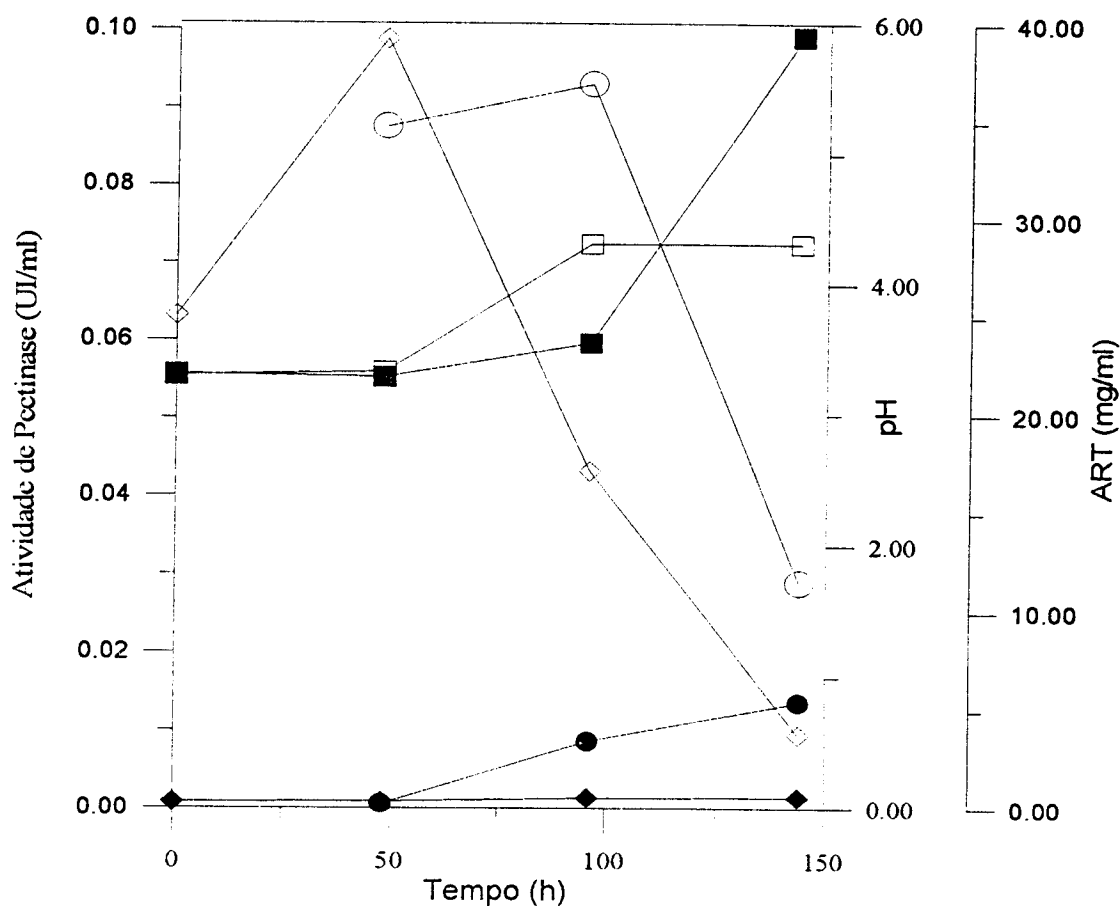


FIGURA 4.1: Efeito do tempo de fermentação sobre ART (Meio A: ◆; Meio B: ◇) e pH (Meio A: ■; Meio B: □) do meio líquido e sobre a produção de pectinase por *Penicillium italicum* IZ 1584 (Meio A: ●; Meio B: ○).

4.3. Fermentação em meio semi-sólido:

4.3.1. Estudo da extração da enzima:

Este estudo buscou avaliar quais as variáveis mais significativas ao processo de extração das enzimas pectinolíticas, além da obtenção de subsídios para fixação do procedimento mais adequado a ser utilizado para a extração em outros experimentos.

Como citado no item 3.7.2.1, foram realizados quatro planejamentos fatoriais diferentes entre si nos níveis utilizados para o tempo de extração. Fez-se isto baseando-se na hipótese de que o tempo de extração, quando incrementado de 1 hora, provocaria variações suaves nas respostas.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 4.3, 4.5, 4.7, 4.9 e 4.11 como atividade de pectinase total (UI / grama de material fermentado seco (MFS)), e como porcentual da máxima atividade de pectinase observada (%). Os efeitos calculados

através da metodologia estatística empregada são apresentados nas Tabelas 4.4, 4.6, 4.8 e 4.10.

TABELA 4.3: Planejamento fatorial (I) para estudo da extração de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja .

Ensaio	(1)	(2)	(3)	(4)	Atividade Enzimática (UI/g MFS)	Resposta (%)
1	-	-	-	-	3,822	71,8
2	+	-	-	-	5,321	100,0
3	-	+	-	-	2,212	41,6
4	+	+	-	-	1,741	32,7
5	-	-	+	-	4,696	88,3
6	+	-	+	-	3,997	75,1
7	-	+	+	-	3,775	70,9
8	+	+	+	-	2,844	53,4
9	-	-	-	+	3,452	64,9
10	+	-	-	+	3,542	66,6
11	-	+	-	+	2,849	53,5
12	+	+	-	+	1,800	33,8
13	-	-	+	+	4,819	90,6
14	+	-	+	+	4,241	79,7
15	-	+	+	+	4,397	82,6
16	+	+	+	+	3,358	63,1

(Fatores: (1) = solvente; (2) = agitação; (3) = diluição; (4) = tempo)

TABELA 4.4: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (I).

Média = 66,79	$\underline{12} = -8,92$	$\underline{123} = 5,70$
	$\underline{13} = -7,80$	$\underline{124} = 1,42$
$\underline{1} = -7,48$	$\underline{14} = -4,62$	$\underline{134} = 4,70$
$\underline{2} = -25,68^*$	$\underline{23} = 9,75$	$\underline{234} = -4,85$
$\underline{3} = 17,35^*$	$\underline{24} = 8,48$	
$\underline{4} = 0,12$	$\underline{34} = 6,95$	$\underline{1234} = -2,50$

No planejamento fatorial realizado com o tempo de extração variando entre 1 hora e 2 horas (Tabela 4.3) observa-se que o efeito mais significativo foi a agitação, conforme os resultados apresentados na Tabela 4.4. A variação proporcionada quando se fez a agitação a 200 rpm em relação à extração em repouso foi de -25,68%, indicando haver menor grau de extração quando se faz a agitação durante a extração. O efeito de primeira ordem mais significativo depois da agitação é o relativo à diluição. Neste caso, a variação da diluição de 1:20 (m:v) para 1:10 (m:v) acarretou em incremento da extração de 17,35%. Os demais efeitos de primeira ordem parecem pouco significativos,

especialmente o tempo de extração, com um efeito de apenas 0,12% quando se aumenta o tempo da extração de 1 para 2 horas. Os efeitos de segunda e terceira ordem não apresentaram significância comparável aos efeitos primários 2 e 3, todos apresentando valores entre -10% e +10%.

Para o planejamento fatorial realizado com o tempo de extração variando de 2 horas para 3 horas (Tabela 4.5), observa-se que os efeitos mais significativos são os de primeira ordem relativos à diluição e à agitação, respectivamente. Como se pode verificar nos resultados apresentados na Tabela 4.6, no primeiro caso houve um aumento de 25,48% da resposta, indicando que o emprego da diluição 1:10 (m:v) foi mais eficiente que o emprego da diluição 1:20 (m:v). No segundo caso, a agitação acarretou em menor extração da enzima, com diminuição de 14,35% em relação à resposta obtida na extração em repouso. Dos quatro efeitos de primeira ordem, o relativo ao tempo de extração foi o menos significativo, seguido do efeito relativo ao solvente empregado.

TABELA 4.5: Planejamento fatorial (II) para estudo da extração de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.

Ensaio	(1)	(2)	(3)	(4)	Atividade Enzimática (UI/g MFS)	Resposta (%)
1	-	-	-	-	3,452	51,0
2	+	-	-	-	3,542	52,3
3	-	+	-	-	2,849	42,1
4	+	+	-	-	1,800	26,6
5	-	-	+	-	4,819	71,2
6	+	-	+	-	4,241	62,7
7	-	+	+	-	4,397	65,0
8	+	+	+	-	3,358	49,6
9	-	-	-	+	3,826	56,5
10	+	-	-	+	3,611	53,4
11	-	+	-	+	1,606	23,7
12	+	+	-	+	2,911	43,0
13	-	-	+	+	6,768	100,0
14	+	-	+	+	4,118	60,8
15	-	+	+	+	4,834	71,4
16	+	+	+	+	4,854	71,7

(Fatores: (1) = solvente; (2) = agitação; (3) = diluição; (4) = tempo)

É interessante notar que entre todos os efeitos, o de interação entre as variáveis solvente, agitação e tempo (124) foi o terceiro mais significativo. Desta forma, este efeito proporcionou um incremento de 10,70% na extração das enzimas.

TABELA 4.6: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (II):

Média = 56,31	$\underline{12}$ = 4,78	$\underline{123}$ = 3,38
$\underline{1}$ = -7,60	$\underline{13}$ = -8,10	$\underline{124}$ = 10,70*
$\underline{2}$ = -14,35*	$\underline{14}$ = 1,92	$\underline{134}$ = -5,68
$\underline{3}$ = 25,48*	$\underline{23}$ = 5,10	$\underline{234}$ = 1,28
$\underline{4}$ = 7,50	$\underline{24}$ = -0,88	$\underline{1234}$ = 0,90
	$\underline{34}$ = 6,35	

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8 para a planejamento fatorial (III), onde o tempo de extração variou de 3 horas para 4 horas, mostram que o efeito de primeira ordem relativo à diluição foi o mais significativo. A mudança da diluição 1:20 (m:v) para 1:10 (m:v) proporcionou um aumento de 26,34% na extração das enzimas. Os demais efeitos de primeira ordem não foram tão significativos como o anterior, com valores entre -8% e +8%. O valor do efeito $\underline{2}$ (agitação) foi de apenas -4,69, demonstrando que o efeito primário da agitação apresentou pouca influência sobre a extração da enzima, no intervalo de tempo estudado.

TABELA 4.7: Planejamento fatorial (III) para estudo da extração de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.

Ensaio	(1)	(2)	(3)	(4)	Atividade Enzimática (UI/g MFS)	Resposta (%)
1	-	-	-	-	3,826	56,5
2	+	-	-	-	3,611	53,4
3	-	+	-	-	1,606	23,7
4	+	+	-	-	2,911	43,0
5	-	-	+	-	6,768	100,0
6	+	-	+	-	4,118	60,8
7	-	+	+	-	4,834	71,4
8	+	+	+	-	4,854	71,7
9	-	-	-	+	4,043	59,7
10	+	-	-	+	3,981	58,8
11	-	+	-	+	5,086	75,1
12	+	+	-	+	2,364	34,9
13	-	-	+	+	4,161	61,5
14	+	-	+	+	5,315	78,5
15	-	+	+	+	6,157	91,0
16	+	+	+	+	5,473	80,9

(Fatores: (1) = solvente; (2) = agitação; (3) = diluição; (4) = tempo)

Entre os efeitos de segunda ordem, o efeito $\underline{24}$ (efeito de interação entre as variáveis agitação e tempo) foi o mais significativo proporcionando um efeito

positivo de 10,54%. Os efeitos de terceira ordem 124 (interação entre solvente, agitação e tempo) e 134 (interação entre solvente, diluição e tempo) também apresentaram valores significativos. O primeiro foi -16,04% enquanto o segundo foi 12,89%. Tais efeitos só foram menos importantes que o efeito de primeira ordem relativo à diluição.

TABELA 4.8: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (III):

Média = 63,81	<u>12</u> = -0,56	<u>123</u> = 3,66
<u>1</u> = -7,11	<u>13</u> = -0,89	<u>124</u> = -16,04*
<u>2</u> = -4,69	<u>14</u> = -1,44	<u>134</u> = 12,89*
<u>3</u> = 26,34*	<u>23</u> = 8,24	<u>234</u> = 1,86
<u>4</u> = 7,49	<u>24</u> = 10,54*	
	<u>34</u> = -5,49	<u>1234</u> = -0,61

O último planejamento fatorial, onde se variou o tempo de extração de 4 horas para 5 horas (Tabela 4.9), apresentou como efeito mais significativo o referente à diluição, conforme os resultados apresentados na Tabela 4.10. Neste caso houve um aumento de 20,80% na extração quando se passou do nível menor para o nível maior. Os demais efeitos de primeira ordem foram menos significativos, inclusive em relação ao efeito de quarta ordem 1234 de interação entre os quatro fatores (-12,12%).

TABELA 4.9: Planejamento fatorial (IV) para estudo da extração de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.

Ensaio	(1)	(2)	(3)	(4)	Atividade Enzimática (UI/g MFS)	Resposta (%)
1	-	-	-	-	4,043	58,8
2	+	-	-	-	3,981	57,9
3	-	+	-	-	5,086	74,0
4	+	+	-	-	2,364	34,4
5	-	-	+	-	4,161	60,5
6	+	-	+	-	5,315	77,3
7	-	+	+	-	6,157	89,6
8	+	+	+	-	5,473	79,6
9	-	-	-	+	3,348	48,7
10	+	-	-	+	3,445	50,1
11	-	+	-	+	1,893	27,5
12	+	+	-	+	4,364	63,5
13	-	-	+	+	4,362	63,5
14	+	-	+	+	6,874	100,0
15	-	+	+	+	4,287	62,4
16	+	+	+	+	3,327	48,4

(Fatores: (1) = solvente; (2) = agitação; (3) = diluição; (4) = tempo)

O efeito primário 2 (agitação) foi praticamente igual ao obtido no planejamento fatorial (III), demonstrando novamente a pequena influência da agitação sobre a extração da enzima. Também foram importantes os efeitos de segunda ordem 12, 14 e 24, além do efeito de terceira ordem 234, conforme os valores apresentados na Tabela 4.10.

TABELA 4.10: Efeitos calculados para o planejamento fatorial (IV):

Média = 62,26	<u>12</u> = -10,18*	<u>123</u> = -9,15
<u>1</u> = 3,28	<u>13</u> = 4,05	<u>124</u> = 6,20
<u>2</u> = -4,68	<u>14</u> = 11,70*	<u>134</u> = -7,78
<u>3</u> = 20,80*	<u>23</u> = -0,65	<u>234</u> = -10,58*
<u>4</u> = -8,50	<u>24</u> = -10,45*	
	<u>34</u> = 0,32	<u>1234</u> = -12,12*

Os planejamentos fatoriais realizados mostraram que a variável diluição foi a que apresentou efeitos de primeira ordem mais pronunciados em todos os intervalos de tempo estudados. A variável agitação pode também ser considerada como sendo importante para o processo, uma vez que seus efeitos de primeira ordem são importantes nos dois primeiros intervalos de tempo estudados. Entretanto a agitação pouco influencia a extração da enzima quando esta é realizada durante períodos superiores a 3 horas. Como os efeitos de primeira ordem relativos ao tempo de extração foram sempre pouco significativos, a hipótese formulada inicialmente de que o incremento de uma hora no tempo de fermentação iria provocar variações suaves nas respostas pode ser considerada válida. A extração foi, de modo geral, pouco influenciada pelos solventes empregados. Observando-se seus efeitos primários (1), pode-se dizer que quando este processo é conduzido por um período de até 4 horas, a utilização de solução 0,1% de Tween 80 é ligeiramente mais efetiva. Com base nos valores dos efeitos de segunda a quarta ordem citados acima, pode-se dizer que o número de efeitos significativos de ordem maior que um aumenta à medida que o tempo de extração é aumentado.

Os ensaios realizados conforme os planejamentos fatoriais acima proporcionaram a possibilidade de comparação entre os cinco tempos de extração utilizados, para as oito diferentes condições de solvente, agitação e diluição empregadas. Os dados são apresentados na Tabela 4.11.

Pela observação dos dados verifica-se que a melhor condição de extração foi aquela onde o material fermentado e seco foi suspenso em água destilada na proporção de 1:10 (m:v), e deixado em repouso durante 5 horas sob temperatura de 30°C (Ensaio 6 / [5h] - Tabela 4.11). A atividade de pectinase obtida com este procedimento foi de 6,874 UI/g de material fermentado seco (MFS).

A segunda melhor condição de extração foi determinada como sendo aquela onde o material foi suspenso em solução aquosa de 0,1% de Tween 80, na proporção de 1:10 (m:v), e deixado em repouso durante 3 horas, sob temperatura de 30°C (Ensaio 5 / [3h] -

Tabela 4.11). Neste caso obteve-se o valor de 6,768 UI/g de material fermentado seco, que representa 98,5 % da atividade verificada na condição ótima anteriormente citada. Como a diferença entre os valores de atividade de pectinase nas duas condições acima é de apenas 1,5% em relação à maior atividade obtida, pode-se considerar a segunda condição de extração como sendo a mais interessante. Isto porque o tempo de extração é diminuído de 5 horas para 3 horas, acarretando uma perda pouco significativa de atividade de pectinase.

TABELA 4.11: Variação da atividade enzimática em função da condição empregada para a extração de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.

Ensaio	Fatores			Atividade de Pectinase (UI/g MFS)				
	(1)	(2)	(3)	[1 h]	[2 h]	[3 h]	[4 h]	[5 h]
1	-	-	-	3,822	3,452	3,826	4,043	3,348
2	+	-	-	5,321	3,542	3,611	3,981	3,445
3	-	+	-	2,212	2,849	1,606	5,086	1,893
4	+	+	-	1,741	1,800	2,911	2,364	4,364
5	-	-	+	4,696	4,819	6,768	4,161	4,362
6	+	-	+	3,997	4,241	4,118	5,315	6,874
7	-	+	+	3,775	4,397	4,834	6,157	4,287
8	+	+	+	2,844	3,358	4,854	5,473	3,327

(Fatores: (1) = solvente; (2) = agitação; (3) = diluição; (4) = tempo)

A agitação durante o processo de extração não provocou aumento na atividade de pectinase em 75% dos ensaios similares, diferenciados apenas pelos níveis de agitação empregados. A influência negativa da agitação contrariou a idéia inicial de que esta iria promover um contato mais eficiente entre a matriz sólida do material fermentado (onde as substâncias extracelulares produzidas pelo fungo se aderem) com o seio do solvente, provocando uma maior extração da enzima. A ineficiência da agitação pode ser até certo ponto explicada verificando-se a granulometria do bagaço empregado. Por haver uma quantidade significativa de finos no bagaço não lavado (Tabela 4.2), pode ter ocorrido maior adsorção das frações pectinolíticas nestas partículas, uma vez que a área superficial destas é aumentada quando os grumos de material fermentado e seco são destruídos devido à agitação. GHILDYAL et al. (1991) verificaram um fato bastante similar quando da extração de amiloglicosidase obtida pela fermentação de farelo de trigo por *Aspergillus niger* em cultivo em meio semi-sólido. Neste caso, a agitação proporcionou um aumento da extração da enzima somente até a terceira hora de extração, ocorrendo uma diminuição significativa da quantidade de enzima extraída no período entre 3 horas e 5 horas de extração. Ao final de 5 horas de extração, a quantidade de enzima extraída com o sistema deixado em repouso foi significativamente maior que aquela obtida sob agitação.

4.3.2. Efeito da lavagem do bagaço de laranja:

A atividade de pectinase obtida quando se empregou bagaço de laranja lavado (meio M2) como substrato foi de $2,00 \times 10^{-1}$ UI/g MFU. Quando se utilizou bagaço de laranja não lavado (meio M5), a atividade de pectinase observada foi de $1,15 \times 10^{-1}$ UI/g MFU. Ao se utilizar o bagaço não lavado houve, portanto, uma diminuição de 42,0% na atividade pectinolítica.

Durante o processamento para a produção de ração, o bagaço de laranja sofre um tratamento químico com hidróxido de sódio para sua neutralização, seguido de um intenso tratamento térmico para a secagem. Este tratamento promove reações cujos produtos podem contribuir direta ou indiretamente para a diminuição da atividade pectinolítica obtida. MALDONADO et al. (1986), em seu estudo sobre produção de pectinase de *Aspergillus* sp utilizando casca de limão submetida a diferentes tratamentos, verificou que o substrato processado industrialmente foi o que proporcionou menores níveis de atividades de poligalacturonase (PG) e pectinaesterase (PMGE). Estes pesquisadores sugerem que os efeitos negativos da temperatura podem ser a desnaturação de substâncias envolvidas na biossíntese das enzimas e/ou a formação de inibidores.

Juntamente com o efeito da alta temperatura de processamento, a elevada concentração de açúcares redutores totais no bagaço não lavado (25,5% em massa) poderia ser um fator inibitório para a produção de atividade de pectinase. Em ambas as hipóteses acima, a lavagem do bagaço poderia minimizar os efeitos das substâncias capazes de inibir a atividade pectinolítica, pois as concentrações destas substâncias seriam drasticamente diminuídas, como se pode verificar pelas diferenças de concentração de açúcares redutores totais nos bagaços lavado e não lavado (item 4.1.4).

Há ainda a possibilidade de uma maior quantidade de enzima ter se adsorvido às partículas do bagaço não lavado, uma vez que este apresenta uma maior proporção de finos em relação ao bagaço lavado, como apresentado no item 4.1.1.

Os erros das medidas de atividade enzimática também foram importantes na definição do bagaço lavado como sendo o mais adequado. Para o bagaço não lavado, o erro experimental obtido com três repetições foi de 288,3% da atividade obtida, enquanto o erro experimental no caso do bagaço lavado (determinado com quatro repetições) foi cerca de 9 vezes menor, atingindo 31,7% em relação à atividade de pectinase obtida. Com a elevada concentração de açúcares no bagaço não lavado e devido à metodologia para determinação de atividade de pectinase se basear na quantificação de açúcares redutores produzidos, a tendência é de que os erros sejam maiores quando do emprego deste bagaço.

4.3.3. Efeito do tempo de fermentação:

O objetivo deste experimento era a obtenção do período de fermentação que propiciasse as maiores atividade e produtividade de pectinase.

Os resultados apresentados na Figura 4.2 mostram não haver produção de atividade pectinolítica até as primeiras vinte e quatro horas de fermentação. A partir de 48 horas, a atividade de pectinase aumenta até atingir o valor de $2,76 \times 10^{-1}$ UI/g MFU, com 120 horas de fermentação. Esta foi a maior atividade pectinolítica observada no período estudado. A atividade enzimática posteriormente diminuiu para cerca de 74% do valor máximo em 144 horas de fermentação, voltando a aumentar em 168 horas de fermentação, quando atingiu $2,71 \times 10^{-1}$ UI/g MFU (98,3% da atividade máxima).

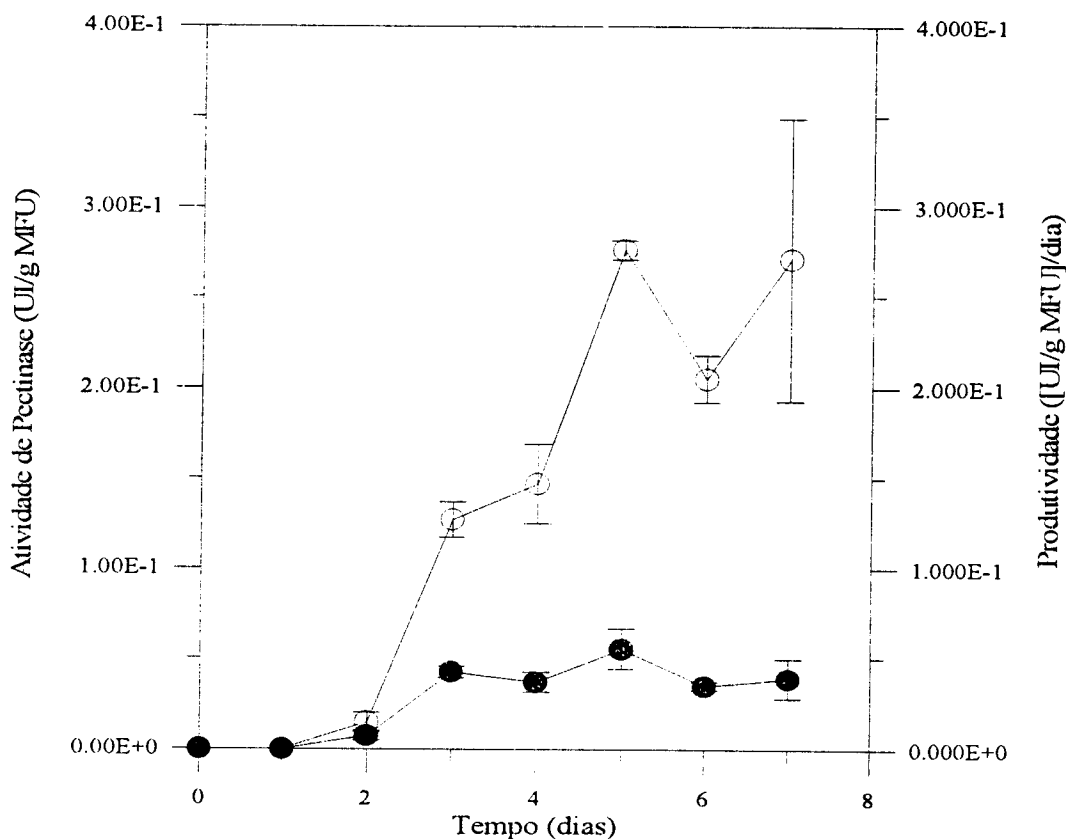


FIGURA 4.2: Efeito do tempo de fermentação sobre a atividade (○) e a produtividade (●) de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.

Em termos de produtividade, o comportamento foi semelhante ao anterior, diferindo apenas para o período de 72 horas a 96 horas de fermentação, quando a produtividade apresentou uma pequena diminuição. O tempo de 120 horas apresentou a máxima produtividade de pectinase, com $5,52 \times 10^{-2}$ (UI/g MFU)/dia de fermentação. Em 168 horas, a produtividade foi de $3,87 \times 10^{-2}$ (UI/g MFU)/dia de fermentação, ou seja, 70,2% da máxima produtividade observada.

O pH do meio de cultivo (Tabela E2 - Anexo E) apresentou variação apenas entre 24 horas e 48 horas de fermentação, mantendo-se no intervalo entre 4,5 e 4,6 nas

primeiras 24 horas e estabilizando-se ao redor de pH 4,0 a partir de 48 horas de fermentação.

4.3.4. Triagem das variáveis:

Este estudo foi realizado segundo o planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} de resolução IV, definido em função do objetivo principal deste experimento, que era selecionar as variáveis mais importantes ao processo fermentativo. No planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} de resolução IV, os efeitos de primeira ordem são confundidos com as interações de terceira ordem, enquanto os efeitos de interação de segunda ordem são confundidos entre si. Em geral, os efeitos de ordem superior são os menos importantes, razão pela qual pode-se considerar que os contrastes de primeira ordem obtidos neste experimento representam razoavelmente bem os efeitos primários, supondo-se que os efeitos terciários sejam realmente pouco significativos.

TABELA 4.12: Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (IV).

Ensaio	I	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	Atividade (UI/g MFU)*	Respostas (%)**
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$2,68 \cdot 10^{-1}$	100,0
2	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	$1,08 \cdot 10^{-1}$	40,3
3	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	$2,02 \cdot 10^{-2}$	7,5
4	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	$7,24 \cdot 10^{-2}$	26,9
5	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	$8,36 \cdot 10^{-2}$	31,1
6	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	$1,07 \cdot 10^{-1}$	39,6
7	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	$7,64 \cdot 10^{-2}$	28,4
8	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	$3,03 \cdot 10^{-2}$	11,2

Cálculo dos contrastes:
Média = 35,6

$l_1 = 12,2$ $l_2 = 34,2$ $l_3 = 16,1$ $l_4 = 26,2$	$l_{12} = l_{34} = 13,4$ $l_{13} = l_{24} = 7,9$ $l_{14} = l_{23} = 18,7$
--	---

(Fatores: (1) = temperatura; (2) = sais; (3) = sacarose; (4) = pH da solução umidificante)

(*): Umidade ao redor de 75% (base úmida)

(**): Porcentagem em relação à atividade máxima.

A Tabela 4.12 apresenta os resultados obtidos, em termos de percentual de atividade máxima observada, juntamente com a matriz de sinais utilizada para o cálculo dos contrastes. Pelos valores calculados, observa-se que o mais significativo é o contraste primário referente ao fator 2 ($l_2 = 34,2$). Portanto a variável “sais” é a que mais influencia o nível de atividade pectinolítica obtida no processo fermentativo. O valor de l_2 indica que a presença dos sais no meio de cultivo proporcionou um aumento de 34,2%

na atividade de pectinase, considerando-se desprezível o efeito terciário referente à interação dos fatores 1,3 e 4.

O contraste referente ao fator 4 ($l_4 = 26,2$) foi o segundo mais significativo, indicando que o emprego da solução umidificante com pH 5,0 proporcionou um acréscimo de 26,2% na atividade enzimática, em relação ao emprego da solução umidificante com pH 3,0.

Quanto à temperatura, o valor do contraste l_1 mostra que sua influência individual na produção de pectinase foi a menor entre as variáveis estudadas. Isto pode ser devido à seleção dos níveis empregada. Talvez a diferença entre estes tenha sido suficientemente ampla para englobar um ponto de máximo de produção de pectinase, ocorrido a uma temperatura intermediária entre 28°C e 34°C.

A presença de sacarose, na concentração utilizada, proporcionou um incremento da produção de pectinase em 16,1%, conforme indica o valor do contraste l_3 calculado.

Os contrastes de ordem dois l_{14} e l_{23} representam a soma dos efeitos de segunda ordem 14 e 23. Desta forma, não se pode concluir qual destes dois efeitos de segunda ordem é o mais importante, uma vez que o valor obtido (18,7) representa a soma desses efeitos. Entretanto, partindo-se do pressuposto de que os contrastes de segunda ordem provavelmente serão tão mais significativos quanto mais significativos os contrastes de primeira ordem envolvidos, pode-se inferir que o efeito secundário 23 deve ser o mais importante.

4.3.5. Efeito da concentração de sais nutrientes:

Cada meio de fermentação foi analisado quanto à atividade pectinolítica e quanto ao pH, e os resultados são apresentados na Figura 4.3.

O desenvolvimento do fungo foi quase imperceptível no meio M8. Isto indicou que a concentração de sais foi suficientemente elevada para praticamente inibir o crescimento microbiano. Como se esperava, para este meio de cultivo não se detectou atividade de pectinase ao término da fermentação.

A atividade de pectinase foi maior quando o meio M2 foi empregado, com $2,00 \times 10^{-1}$ UI / g MFU. Entretanto não se pode afirmar que a condição de concentração de sais deste meio seja a melhor, pois a atividade pectinolítica obtida com o meio M7 ($1,92 \times 10^{-1}$ UI / g MFU) foi muito próxima daquela obtida com o meio M2.

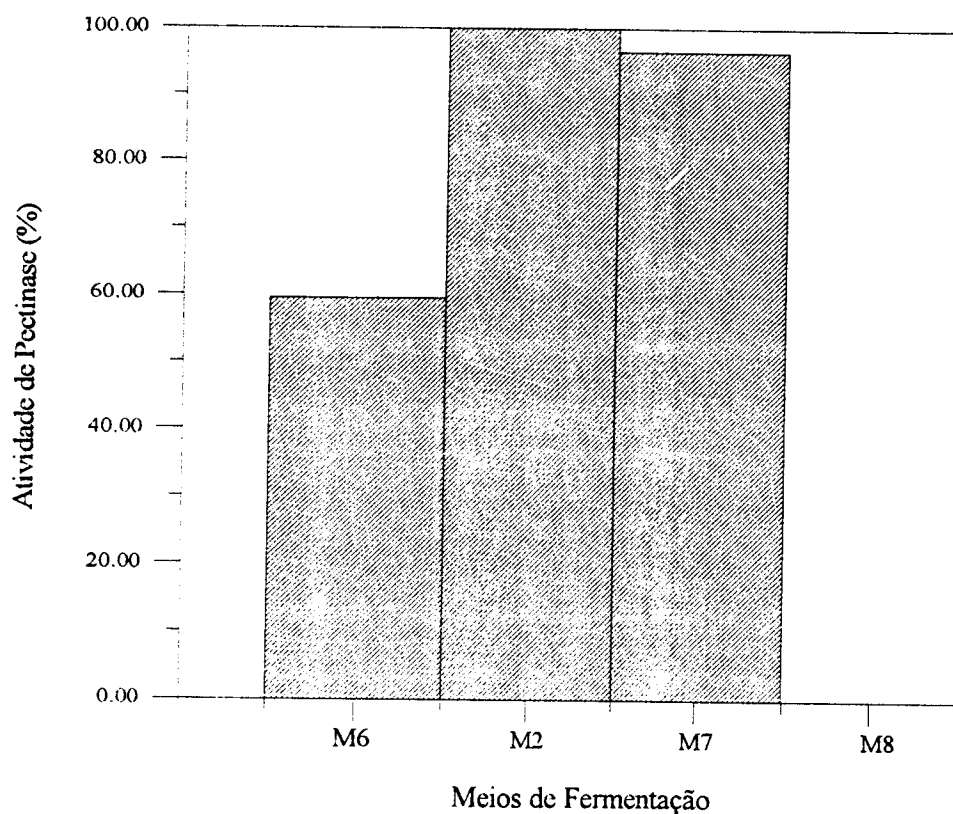


FIGURA 4.3: Efeito da concentração de sais nutrientes sobre a produção de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 158 cultivado em bagaço de laranja.

4.3.6. Efeito da presença e tipo dos açúcares:

Os resultados obtidos para a atividade de pectinase são apresentados na Figura 4.4. A máxima atividade foi obtida com o meio M4, após 9 dias de fermentação, obtendo-se o valor de $2,33 \times 10^{-1}$ UI/g de material fermentado úmido (MFU). O erro desta medida foi $2,9 \times 10^{-2}$ UI/g MFU. O meio M2 apresentou atividade máxima de pectinase de $2,00 \times 10^{-1}$ UI/g MFU no sexto dia de fermentação, com um erro de $2,4 \times 10^{-2}$ UI/g MFU. Considerando-se os erros, pode-se dizer que a diferença entre os dois valores de atividade de pectinase não é significativa. Calculando-se a produtividade obtem-se $2,59 \times 10^{-2}$ (UI/g MFU)/dia de fermentação para o meio M4, com nove dias de fermentação. Este valor é inferior à produtividade obtida com o meio M2, com 6 dias de fermentação, que foi de $3,33 \times 10^{-2}$ (UI/g MFU)/dia de fermentação. Os erros neste caso são de $3,2 \times 10^{-3}$ (UI/g MFU)/dia de fermentação para o meio M4 e de $4,0 \times 10^{-3}$ (UI/g MFU)/dia de fermentação para o meio M2.

Os resultados apresentados sugerem que os meios M2 e M3 comportam-se de maneira semelhante em relação às variações na atividade de pectinase em função do tempo de fermentação, apesar da presença dos açúcares provenientes da matéria-prima não lavada no meio M3. Observaram-se erros muito grandes nas determinações de atividade de pectinase nas amostras com 7, 8, 10 e 15 dias de fermentação.

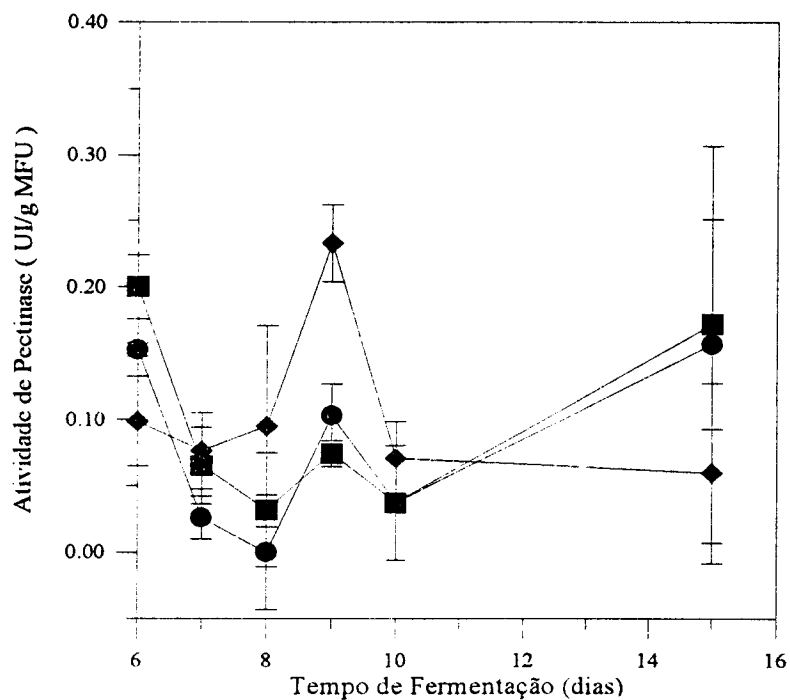


FIGURA 4.4: Efeito do tempo de fermentação sobre a produção de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja, para os meios M2 (■), M3 (●) e M4 (◆).

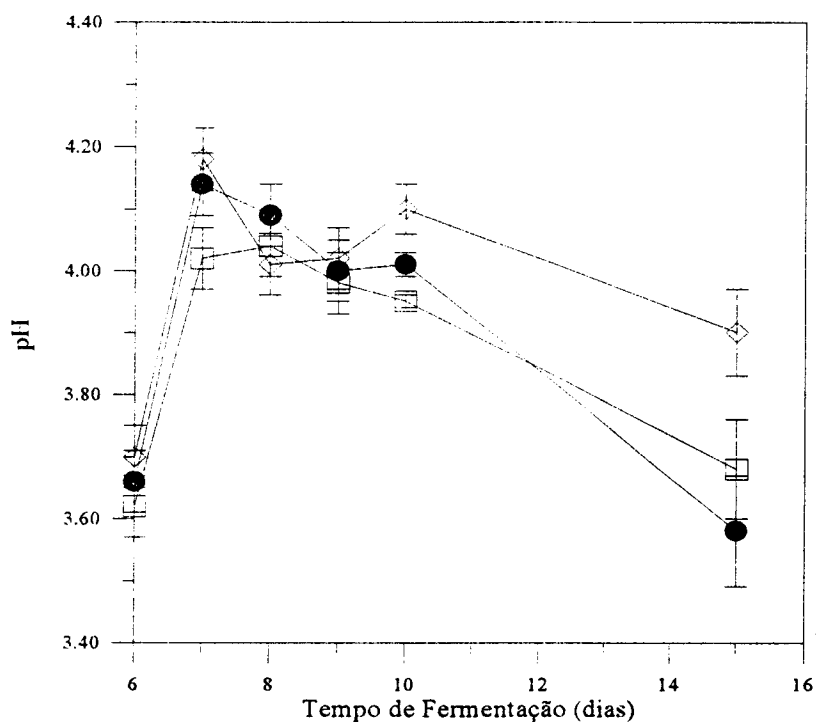


FIGURA 4.5: Efeito do tempo sobre o pH dos meios de fermentação M2 (◇), M3 (●) e M4(□) para produção de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, cultivado em bagaço de laranja.

Em relação ao pH dos meios de fermentação, sua variação com o tempo de fermentação é muito semelhante nos três casos, conforme mostra a Figura 4.5. Entre o sexto e sétimo dia de fermentação, o pH dos meios M2, M3 e M4 varia de 3,70 para 4,18, 3,66 para 4,14 e 3,62 para 4,02, respectivamente. No período de 8 a 10 dias de fermentação os valores de pH para os três meios de cultura se mantêm sempre muito próximos de 4,00, apresentando um ligeiro decréscimo no décimo quinto dia de fermentação. As determinações do pH foram realizadas em duplicatas somente para as amostras dos dias 10 e 15 (item 3.8.2). Os erros para as medidas realizadas nos períodos anteriores foram estimados como sendo a média dos desvios verificados nas amostras dos dias 10 e 15.

4.3.7. Efeito do pH sobre a atividade de pectinase:

A determinação da atividade de pectinase em função do pH da solução de reação enzimática foi realizada em dois ensaios diferenciados, cujos resultados são apresentados na Figura 4.6 (Ensaio C e D).

No Ensaio C, a maior atividade ($1,50 \times 10^{-1}$ UI/g MFU) foi obtida quando se utilizou tampão borato 0,1M pH 8,7, enquanto que no Ensaio D o máximo de atividade obtido ($2,31 \times 10^{-1}$ UI/g MFU) foi com o mesmo tampão, porém a pH 8,0.

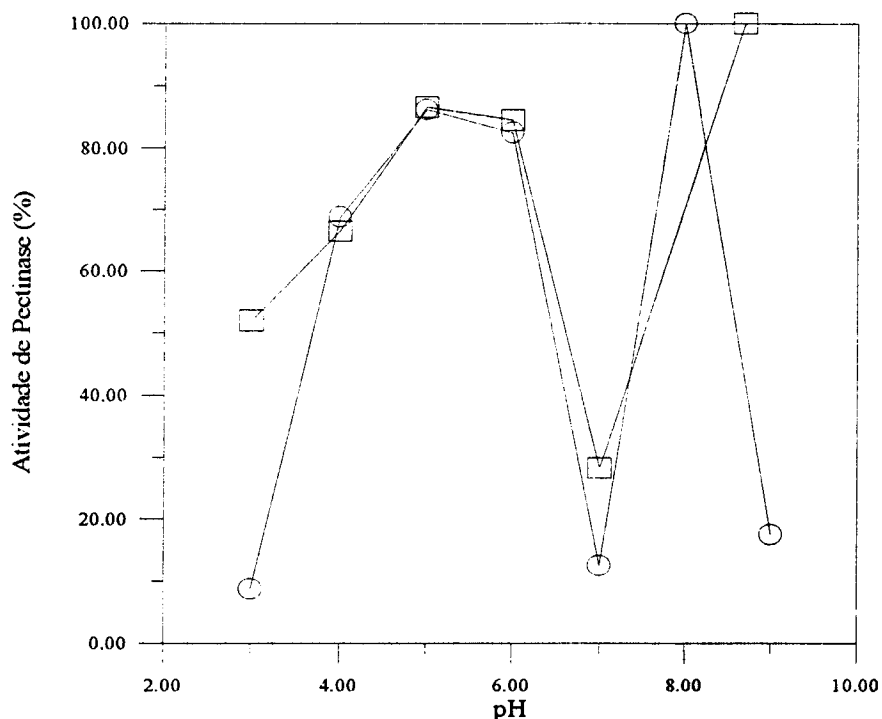


FIGURA 4.6: Efeito do pH da solução de reação enzimática sobre a atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584 (Ensaio C: □ ; Ensaio D: ○).

Através da Figura 4.6 verifica-se que a atividade de pectinase apresentou dois pontos de máximo. O primeiro ocorreu em pH ácido, entre os valores de pH 4,0 e pH 6,0. O segundo aconteceu sob pH alcalino, acima de pH 7,0. A presença de dois pontos de máximo sugere a existência de ao menos duas frações pectinolíticas distintas no sistema enzimático do fungo *Penicillium italicum* IZ1584.

4.3.8. Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinase:

Pela observação da Figura 4.7, os valores percentuais de atividade obtidos no Ensaio D apresentam dois pontos de máximo. O primeiro sendo no intervalo entre 30°C e 40°C, e o segundo no intervalo entre 40°C e 50°C.

Para o Ensaio C, o segundo ponto de máximo ocorreu no intervalo entre 40°C e 50°C, de forma idêntica ao Ensaio D. Entretanto, o primeiro ponto de máximo ocorreu abaixo de 35°C. Este comportamento diferenciado pode ter acontecido devido aos efeitos (isolados ou conjuntos) dos diferentes períodos de fermentação (5 dias e 7 dias), e da estocagem sob refrigeração do material fermentado empregado no Ensaio C.

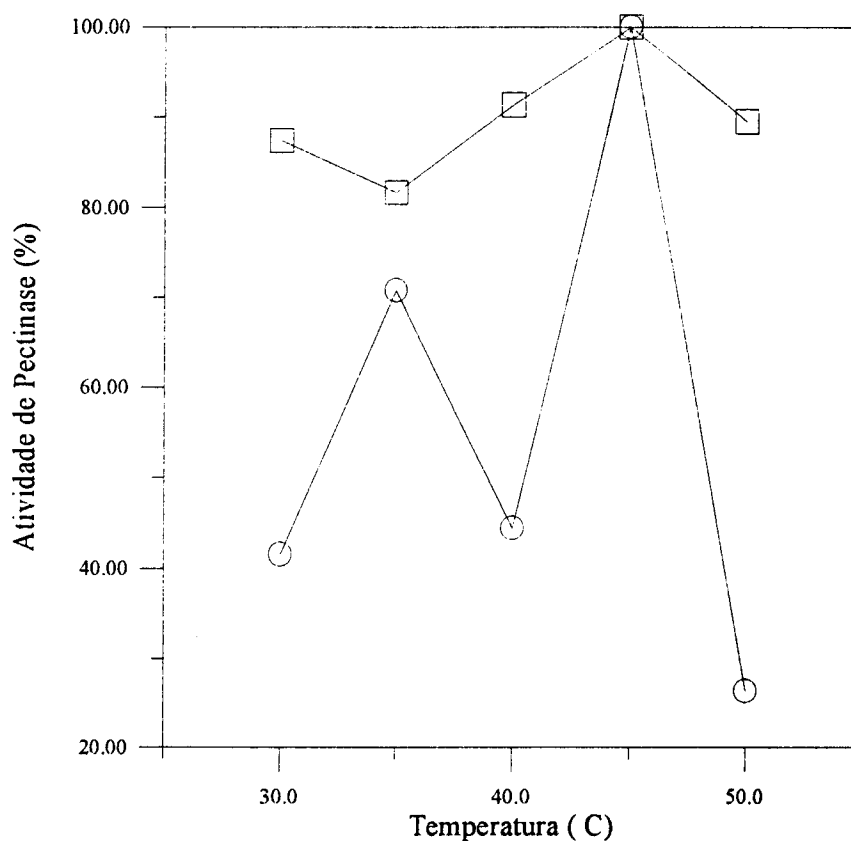


FIGURA 4.7: Efeito da temperatura de incubação da reação enzimática sobre a atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584 (Ensaio C: □ ; Ensaio D: ○).

A presença de dois pontos de máximo, assim como no caso do experimento do efeito do pH, sugere que o sistema pectinolítico do fungo é composto por pelo menos duas frações pectinolíticas distintas.

4.3.9. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima para a atividade de pectinase:

A determinação dos valores de pH e temperatura ótimos, na faixa de pH ácido, foi realizada através de um planejamento estatístico de superfície de resposta, denominado como planejamento estrela. Tal planejamento foi elaborado baseado nos dados obtidos nos experimentos apresentados nos itens 4.3.7 e 4.3.8, através dos quais foram fixadas as faixas de pH e temperatura estudadas neste experimento. O planejamento estrela e os resultados observados são apresentados na Tabela 4.13 e na Figura 4.8.

TABELA 4.13: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584, produzida por fermentação em meio semi-sólido de bagaço de laranja.

pH	T (°C)	x ₁	x ₂	Atividade de Pectinase		Erro	
				UI/g MFU	% (*)	UI/g MFU	%
5,5	45	0	0	4,16 x 10 ⁻¹	100,0	ND	ND
6,0	42	1	-1	1,92 x 10 ⁻¹	46,1	3,06 x 10 ⁻²	7,4
5,0	42	-1	-1	2,34 x 10 ⁻¹	56,2	2,85 x 10 ⁻²	6,9
6,0	48	1	1	1,76 x 10 ⁻¹	42,3	1,64 x 10 ⁻²	3,9
5,0	48	-1	1	2,85 x 10 ⁻¹	68,7	1,22 x 10 ⁻²	3,0
6,2	45	2 ^{1/2}	0	2,04 x 10 ⁻¹	49,3	1,18 x 10 ⁻¹	28,5
4,8	45	-2 ^{1/2}	0	2,54 x 10 ⁻¹	61,1	4,89 x 10 ⁻²	11,8
5,5	49	0	2 ^{1/2}	2,80 x 10 ⁻¹	67,6	2,04 x 10 ⁻³	0,5
5,5	41	0	-2 ^{1/2}	1,31 x 10 ⁻¹	31,6	1,04 x 10 ⁻¹	25,0

(*): Porcentagem em relação à atividade máxima

(ND: não determinado)

A modelagem para o ajuste de um polinômio de grau 2 foi realizada através do programa MODREG (BRUNS et al., 1995), obtendo-se a Equação (1) que relaciona a atividade enzimática percentual com as variáveis adimensionais de pH (x₁) e de temperatura (x₂).

$$Y = 100,00 - 6,64 \cdot (x_1) + 7,47 \cdot (x_2) - 22,16 \cdot (x_1)^2 - 24,93 \cdot (x_2)^2 - 4,08 \cdot (x_1) \cdot (x_2) \quad (1)$$

Onde: $Y = \text{atividade de pectinase (\%)}$
 $(x_1) = (\text{pH} - 5,50) / 0,50$
 $(x_2) = (T - 45) / 3$; $(T \text{ em } ^\circ\text{C})$

Os valores do Teste F calculados foram comparados com os valores tabelados para a Distribuição F (5%), com os respectivos valores de grau de liberdade (BRUNS et al., 1995). Verificou-se que F (regressão / resíduos) = 3,79 é maior que $F_{5,11} = 3,20$, indicando que a regressão é significativa ao nível de 95% de confiança. O outro valor do Teste F, F (falta de ajuste / erro puro) = 0,862, é menor que $F_{3,8} = 4,07$, não existindo portanto evidência de falta de ajuste ao nível de 95% de confiança.

Pode-se afirmar, com base nos resultados da análise de variância (Tabela 4.14), que o polinômio ajustado consegue descrever de forma bastante razoável a variação da atividade de pectinase em função da temperatura e do pH, dentro das faixas de pH e temperatura nas quais este experimento foi realizado. Os erros associados aos coeficientes da Equação (1) são apresentados na Tabela 4.15.

TABELA 4.14: Análise de variância.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	Distribuição F (5%)
Regressão	3880,79	5	776,16	3,789	$F_{5,11} = 3,20$
Resíduos	2253,29	11	204,84		
Falta de Ajuste	550,51	3	183,50	0,862	$F_{3,8} = 4,07$
Erro Puro	1702,78	8	212,85		
Total	6134,08	16			
Porcentual de Variância Explicada = 63,27 %					
Porcentual Máximo de Variância Explicável = 72,24%					

TABELA 4.15: Erros associados aos coeficientes da Equação (1).

Coeficiente da Equação	Erro Associado
100,00	$(204,84)^{1/2} = 14,31$
- 6,64	$(12,80)^{1/2} = 3,58$
7,47	$(12,80)^{1/2} = 3,58$
- 22,16	$(60,81)^{1/2} = 7,80$
- 24,93	$(60,81)^{1/2} = 7,80$
- 4,08	$(25,61)^{1/2} = 5,06$

A análise estatística demonstrou que os erros dos coeficientes dos termos lineares (x_1 e x_2) e do termo sinérgico ($x_1 \cdot x_2$) não são significativos ao nível de 95% de confiança. Logo, estes termos devem ser retirados da Equação (1), obtendo-se a Equação (2) abaixo.

$$Y = 100,00 - 22,16 \cdot (x_1)^2 - 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad (2)$$

A partir da Equação (2) calculou-se o ponto de máximo de atividade enzimática, fazendo-se as derivadas parciais com respeito às variáveis x_1 e x_2 iguais a zero.

$$(\partial Y / \partial x_1) = - 44,32 \cdot x_1 = 0 \Rightarrow x_1 = 0$$

$$(\partial Y / \partial x_2) = - 49,86 \cdot x_2 = 0 \Rightarrow x_2 = 0$$

O ponto central do planejamento estrela coincidiu com o ponto de máximo de atividade de pectinase. Substituindo-se os valores das variáveis adimensionais x_1 e x_2 nas relações abaixo, obtém-se os valores de temperatura e pH que proporcionam a máxima atividade pectinolítica.

$$x_1 = (\text{pH} - 5,5) / 0,5 = 0 \Rightarrow \text{pH} = 5,5$$

$$x_2 = (T - 45) / 3 = 0 \Rightarrow T = 45^\circ\text{C}$$

Os resultados obtidos no item 4.3.7, em conjunto com os resultados do planejamento estatístico apresentado anteriormente, demonstraram que o pH 5,5 é o que proporciona maior atividade pectinolítica na região de pH ácido. Quanto à temperatura, a observação conjunta dos resultados deste experimento com aqueles obtidos no item 4.3.8 permitiu verificar que a temperatura de 45°C é a temperatura ótima para a atividade pectinolítica, dentro dos limites estudados.

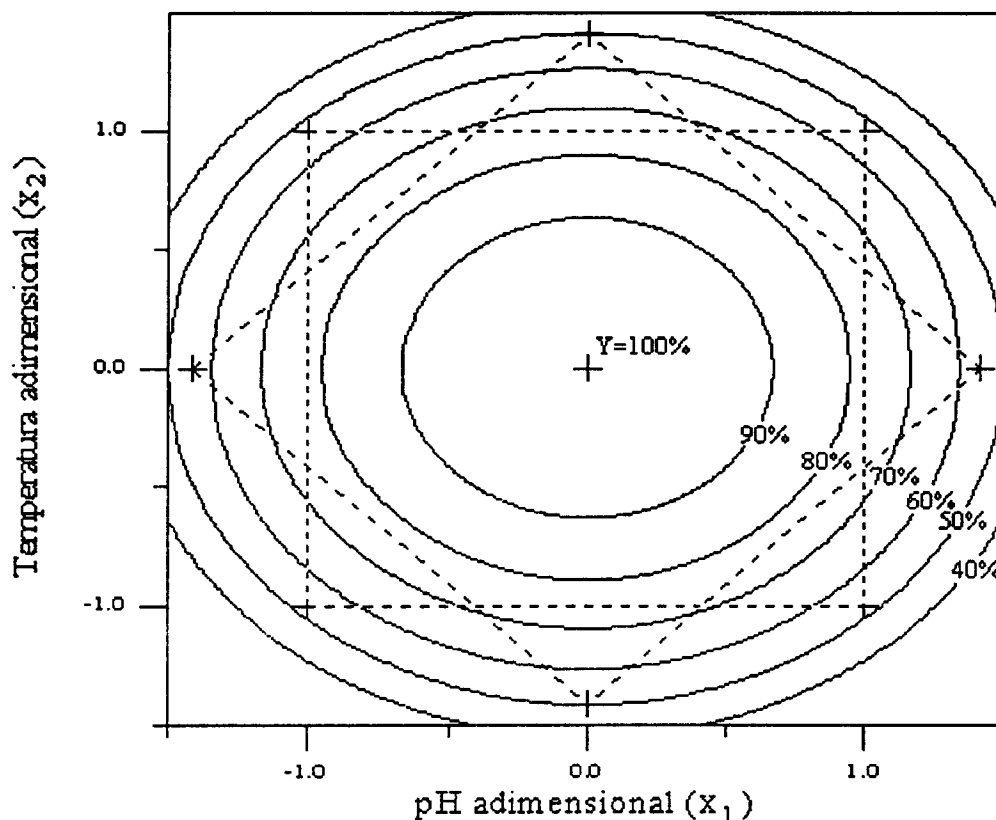


FIGURA 4.8: Curvas de nível (Equação 2) e pontos experimentais apresentando a atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ1584 cultivado em bagaço de laranja, em função da temperatura adimensional (x_2) e do pH adimensional (x_1).

É interessante notar que neste caso o ponto ótimo de atividade enzimática em relação ao pH e à temperatura foi praticamente o mesmo verificado quando se estudou o efeito de cada uma das variáveis isoladamente, como se pode perceber através das Figuras 4.6, 4.7 e 4.8. Isto pode ser justificado pelo fato do efeito de interação das variáveis pH e temperatura não ter sido importante para a atividade de pectinase, na região onde este experimento foi realizado. Além disso, o nível de temperatura fixado no experimento do item 4.3.7 foi o mesmo determinado como valor de temperatura ótima; e o nível de pH fixado para o item 4.3.8, foi muito próximo do valor determinado como sendo o pH ótimo para a atividade enzimática.

A maior atividade de pectinase observada neste estudo ($4,16 \times 10^{-1}$ UI/g MFU - Tabela 4.13) foi a maior atividade também em relação a todos os demais ensaios de fermentação semi-sólida. Neste caso, todas as variáveis da fermentação, da extração e da determinação da atividade enzimática estudadas foram empregadas nos níveis que demonstraram ser os mais adequados para a produção de pectinase (item 3.7.2.9). As únicas exceções foram a proporção de solvente utilizado na extração (1:5 - massa:volume) e o tempo de fermentação (7 dias ao invés de 5 dias).

5. CONCLUSÃO

O fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 é capaz de produzir a enzima pectinase extracelularmente, sendo esta atividade incrementada quando a sacarose está presente no meio de cultivo, tanto na fermentação submersa quanto na fermentação em meio semi-sólido.

A condição mais adequada de extração de pectinase produzida através de fermentação em meio semi-sólido foi aquela onde o material fermentado foi suspenso em solução aquosa de 0,1% de Tween 80, na proporção 1:10 (m:v), e deixado em repouso por 3 horas, sob temperatura de 30°C.

Os sais nutrientes demonstraram ser a variável que mais fortemente influencia a produção de pectinase durante a fermentação em meio semi-sólido. As concentrações que proporcionaram os maiores níveis de produção de pectinase foram: NH_4NO_3 1,20 g / 20 g de bagaço de laranja; KH_2PO_4 0,08 g / 20 g de bagaço de laranja; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g / 20 g de bagaço de laranja.

O pH da solução umidificante proporcionou melhores resultados quando ajustado para pH 5,0, demonstrando também ser um fator significativo para a otimização do meio de fermentação.

A produção de pectinase por fermentação em meio semi-sólido apresentou maiores atividade e produtividade quando o período de fermentação foi de 120 horas (5 dias).

A variação da temperatura de fermentação de 28°C para 34°C apresentou menor influência sobre os níveis de pectinase produzidos comparando-se com as demais variáveis estudadas, sendo que os melhores resultados foram obtidos à temperatura de 34°C.

O bagaço de laranja lavado demonstrou ser mais efetivo como substrato para a produção de pectinase frente ao bagaço de laranja não lavado.

Na região de pH ácido, a atividade de pectinase de *Penicillium italicum* IZ 1584 apresentou pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 45°C.

O sistema pectinolítico do fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 provavelmente é constituído por pelo menos duas frações pectinolíticas distintas.

6. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

- Estudo com bagaços de laranja (e de outros cítricos) não processados, ou apenas parcialmente neutralizados.

- Estudo da separação, purificação e caracterização de cada fração pectinolítica produzida pelo fungo; a purificação da pectinase, mesmo sem a separação das frações, seria de grande importância para melhoria da determinação analítica da atividade de pectinase total, pois diminuiria ou eliminaria possíveis interferentes.

- Estudo sobre a estabilidade da enzima

- Otimização do meio de cultura semi-sólido no sistema empregado, através da determinação do pH ótimo da solução umidificante e das concentrações ótimas de sacarose e de sais nutrientes (neste caso, entre as concentrações definidas nos meios M2 e M7). E estudo para ampliação de escala (bandejas, colunas, tambor rotativo), incluindo a variável aeração.

- Verificação da ausência ou presença de micotoxinas no extrato enzimático, uma vez que o fungo *Penicillium italicum* é reportado na literatura (FRISVAD e SAMSON, 1991) como sendo um possível produtor da micotoxina desoxibrevianamida E, 5,6-dihidro-4-metoxi-2H-pirano-2-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M. D.; DOMINGUEZ, J. D.; LLAMA, M. J.; SERRA, J.L. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 55, n. 6, p. 1612-1616, Jun., 1989.
- ALANA, A.; ALKORTA, I.; DOMINGUEZ, J. D.; LLAMA, M. J.; SERRA, J.L. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 12, p. 3755-3759, Dec., 1990.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, Rio de Janeiro: NBR-6023; Referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 1989. 18 p.
- BARACAT, M. C.; VALENTIM, C.; MUCHOVEJ, J. J.; SILVA, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. Biotechnology Letters, Surrey, v. 11, n. 12, p. 899-902, Dec., 1989.
- BARACAT, M. C.; VANETTI, M. C. D.; ARAUJO, E. F.; SILVA, D. O. Growth conditions of a pectinolytic *Aspergillus fumigatus* for degumming natural fibres. Biotechnology Letters, Surrey, v. 13, n. 10, p. 693-696, Oct., 1991.
- BARACAT-PEREIRA, M. C.; VANETTI, M. C. D.; ARAUJO, E. F.; SILVA, D. O. Partial characterization of *Aspergillus fumigatus* polygalacturonases for the degumming of natural fibers. Journal of Industrial Microbiology, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 139-142, May, 1993.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO F. O. Carboidratos. In: _____; _____ Introdução à química de alimentos. Campinas: Fundação Cargill, 1985. p. 70-75.
- BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAUJO, E. F.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v.9, n.2, p.225-228, Mar., 1993.
- BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Ed. UNICAMP, 1995. 299 p.
- CHAN, W.-Y.; CHIANG, B.-H. Production of clear guava nectar. International Journal of Food Science and Technology, London, v. 27, n. 4, p. 435-441, Aug., 1992.
- CUERO, R. G.; SMITH, J. E.; LACEY, J. A novel containment system for laboratory-scale solid particulate fermentations. Biotechnology Letters, Surrey, v. 7, n. 7, p. 463-466, Jul., 1985.

- FOGARTY, W. M.; KELLY C. T. Developments in microbial extracellular enzymes. In: WISEMAN, A. (ed.) Topics in enzyme and fermentation biotechnology. Chichester: Ellis Horwood, 1979. v. 3, cap. 3, p. 60-67.
- FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. Process Biochemistry, London, v. 7, n. 8, p. 13-17, Aug., 1972.
- FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectinases and pectic polysaccharides. In: HOCKENHULL, D.J.D. (ed.) Progress in industrial microbiology. London: Churchill Livingstone, 1974. v. 13, p. 59-119.
- FRIEDRICH, J.; CIMERMAN A.; STEINER W. Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger* on sucrose. Food Biotechnology, New York, v. 6, n. 3, p. 207-216, 1992.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. J.; MARTH, E. H. (ed.) Handbook of applied mycology: foods and feeds. New York: Marcel Dekker, 1991. v. 3, cap. 2, p. 31-68.
- GERHARTZ, W. Enzymes in industry: production and applications. Weinheim: VCH, 1990. 321 p.
- GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, S. V.; DEVI, P. N.; LONSANE, B. K.; ASTHANA, H. N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. Journal of Food Science and Technology, Mysore, v. 18, n. 6, p. 248-251, Nov.-Dec., 1981.
- GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B. K.; KARANTH, N. G. Efficient and simple extraction of mouldy bran in a pulsed column extractor for recovery of amyloglucosidase in concentrated form. Process Biochemistry, London, v. 26, n. 4, p. 235-241, Aug., 1991.
- GUTIERREZ-ROJAS, M.; FAVELA TORRES, E., Curso de fermentaciones en medio solido. Biotecnologia para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales. Jaguariuna: EMBRAPA, 1992. 80 p. (Apostila do curso).
- HESSELTINE, C. W. Biotechnology report: solid state fermentations. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 14, n. 4, p. 517-532, Jul., 1972.
- KERTESZ, Z. I. The pectic substances. New York: Interscience, 1951. 628 p.
- LEBLOND, D. Technology helps firms meet biotech challenge. European Chem. News. , p. 24, Jun., 1990. Apud: DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalysts for food processes. Food Technology , Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, Jan., 1991.

- MACMILLAN, J. D.; SHEIMAN, M. I. Pectic enzymes. In: WHITAKER, J. R. (ed.) Food related enzymes. Washington: ACS, 1974. p. 101-130. (Advances in Chemistry Series, 136).
- MAIORANO, A. E. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. São Paulo, 1990. 165 p. Tese de doutorado em Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- MALDONADO, M. C.; NAVARRO, A.; CALLIERI, D.A.S. Production of pectinases by *Aspergillus* sp using differently pretreated lemon peel as the carbon source. Biotechnology Letters, Surrey, v. 8, n. 7, p. 501-504, Jul., 1986.
- McCREADY, R. M. Carbohydrates: composition, distribution, significance. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; VELDHUIS, M. K. (ed.) Citrus science and technology. Westport: AVI, 1977. v.1, cap.3, p. 74-109.
- MENEZES, T. J. B.; SALVA, T. J. G.; BALDINI, V. L.; PAPINI, R. S.; SALES, A. M. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. Process Biochemistry, London, v. 24, n. 5, p. 167-171, Oct., 1989.
- ORIOLE, E.; SCHETTINO B.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT M. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. Journal of Fermentation Technology, Tokyo, v. 66, n. 1, p.57-62, Feb., 1988.
- PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. Process Biochemistry, London, v. 26, n. 6, p. 355-366, Dec., 1991.
- PEPPLER, H. J.; REED, G. Enzymes in food and feed processing. In: KENNEDY, J. F. (ed.) Enzyme technology. Weinheim: VCH, 1987. v. 7a, cap. 11, p. 581-586. (Biotechnology).
- PLATT, W. C.; POSTON, A. L. U.S. Patent 3.085.887 (1962) In: FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. Process Biochemistry, London, v. 7, n. 8, p. 13-17, Aug., 1972.
- RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Purification and characterization of extracellular enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 58, n. 2, p. 578-583, Feb., 1992.
- ROMBOUITS, F. M.; PILNIK, W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. Process Biochemistry, London, v. 13, n. 8, p. 9-13, Aug., 1978.
- SCHWIMMER, S. Roles of enzyme action in wine and fruit and vegetable juice manufacture and appearance. In: _____ Source book of food enzymology. Westport : AVI, 1981. p. 511-551.

- SILVA, D. O.; ATTWOOD, M. M.; TEMPEST, D. O. Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 9, n. 5, p. 574-578, Sep., 1993.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry, v. 195, p.19, 1952.
- WANG, M. C.; KEEN, N. T. Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.141, p. 749-757, 1970.
- WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. (ed.). Microbial enzymes and biotechnology. 2 ed. London: Elsevier, 1990. Cap. 4, p.133-176.

ANEXOS

Anexo A:

Equações obtidas a partir da equação (2) utilizadas para a obtenção das curvas de nível da Figura 4.8 - Temperatura e pH ótimos:

$$Y = 100: \quad -22,16 \cdot (x_1)^2 = 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad x_1 = x_2 = 0$$

$$Y = 90: \quad 10 = 22,16 \cdot (x_1)^2 + 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad (x_2) = [(10 - 22,16 \cdot (x_1)^2) / 24,93]^{1/2}$$

$$Y = 80: \quad 20 = 22,16 \cdot (x_1)^2 + 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad (x_2) = [(20 - 22,16 \cdot (x_1)^2) / 24,93]^{1/2}$$

$$Y = 70: \quad 30 = 22,16 \cdot (x_1)^2 + 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad (x_2) = [(30 - 22,16 \cdot (x_1)^2) / 24,93]^{1/2}$$

$$Y = 60: \quad 40 = 22,16 \cdot (x_1)^2 + 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad (x_2) = [(40 - 22,16 \cdot (x_1)^2) / 24,93]^{1/2}$$

$$Y = 50: \quad 50 = 22,16 \cdot (x_1)^2 + 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad (x_2) = [(50 - 22,16 \cdot (x_1)^2) / 24,93]^{1/2}$$

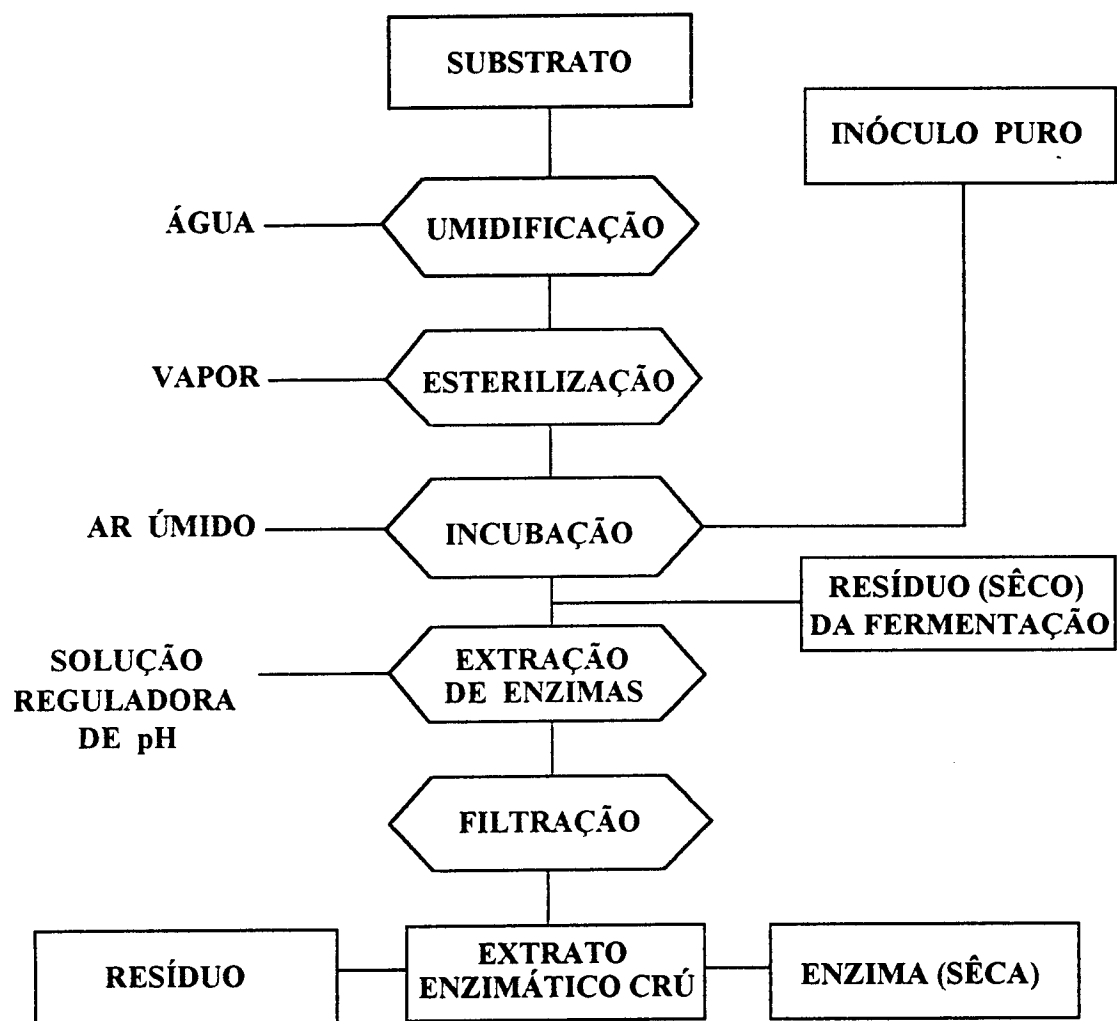
$$Y = 40: \quad 60 = 22,16 \cdot (x_1)^2 + 24,93 \cdot (x_2)^2 \quad \Rightarrow \quad (x_2) = [(60 - 22,16 \cdot (x_1)^2) / 24,93]^{1/2}$$

Pontos experimentais utilizados na Figura 4.8, com valores de Y experimental e Y calculado pela equação (2):

x_1	x_2	Y experim.	Y eq.(2)	Y eq.(2) - Y experim.
0	0	100,0	100,0	0
1	-1	46,1	52,9	6,8
-1	-1	56,2	52,9	-3,3
1	1	42,3	52,9	10,6
-1	1	68,7	52,9	-15,8
$2^{1/2}$	0	49,3	55,7	6,4
$-2^{1/2}$	0	61,1	55,7	-5,4
0	$2^{1/2}$	67,6	50,1	-17,5
0	$-2^{1/2}$	31,6	50,1	18,5

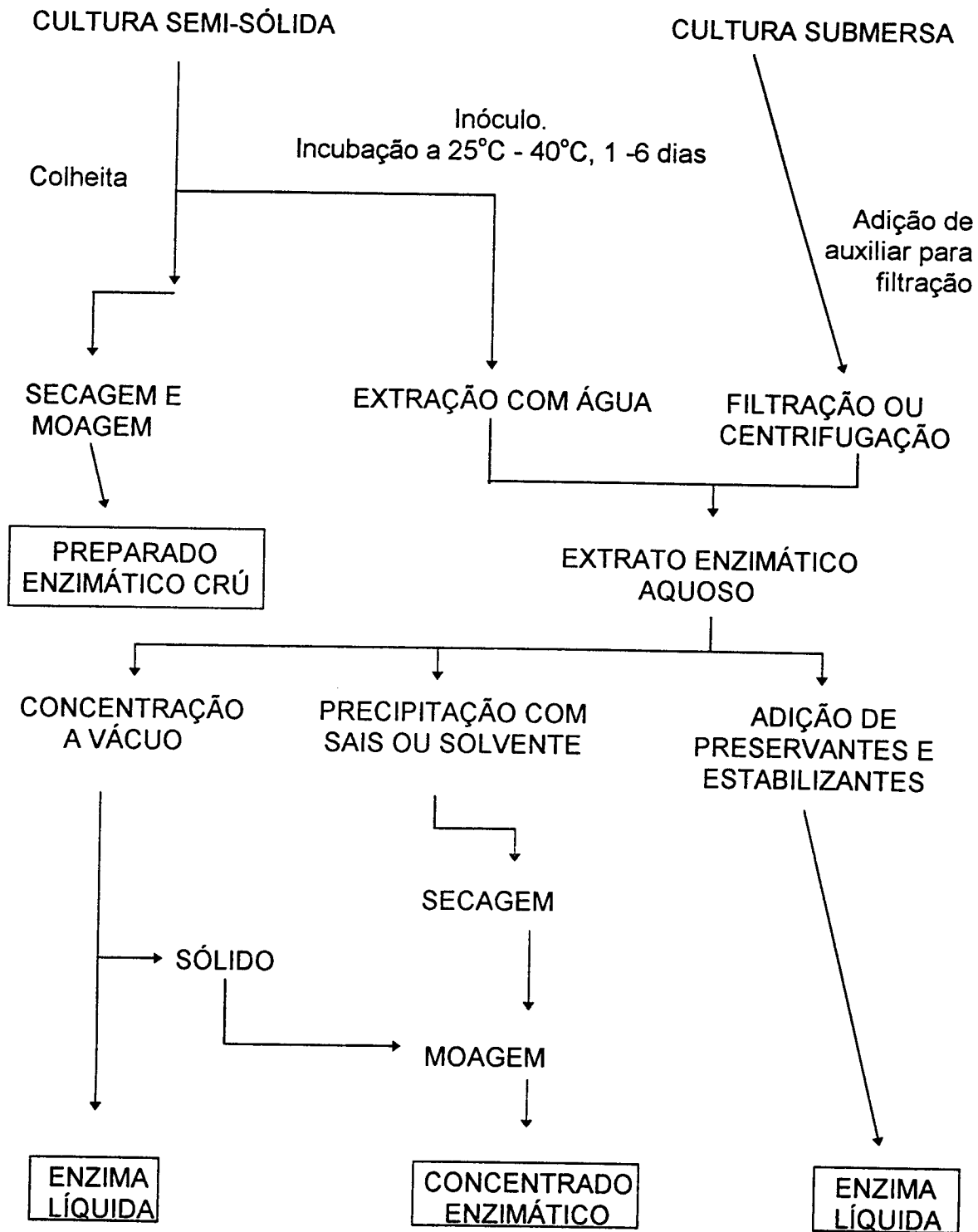
Anexo B:

Produção de enzimas por fermentação em meio semi-sólido (Fonte: GUTIERREZ ROJAS e FAVELA TORRES, 1992 - p. 8).



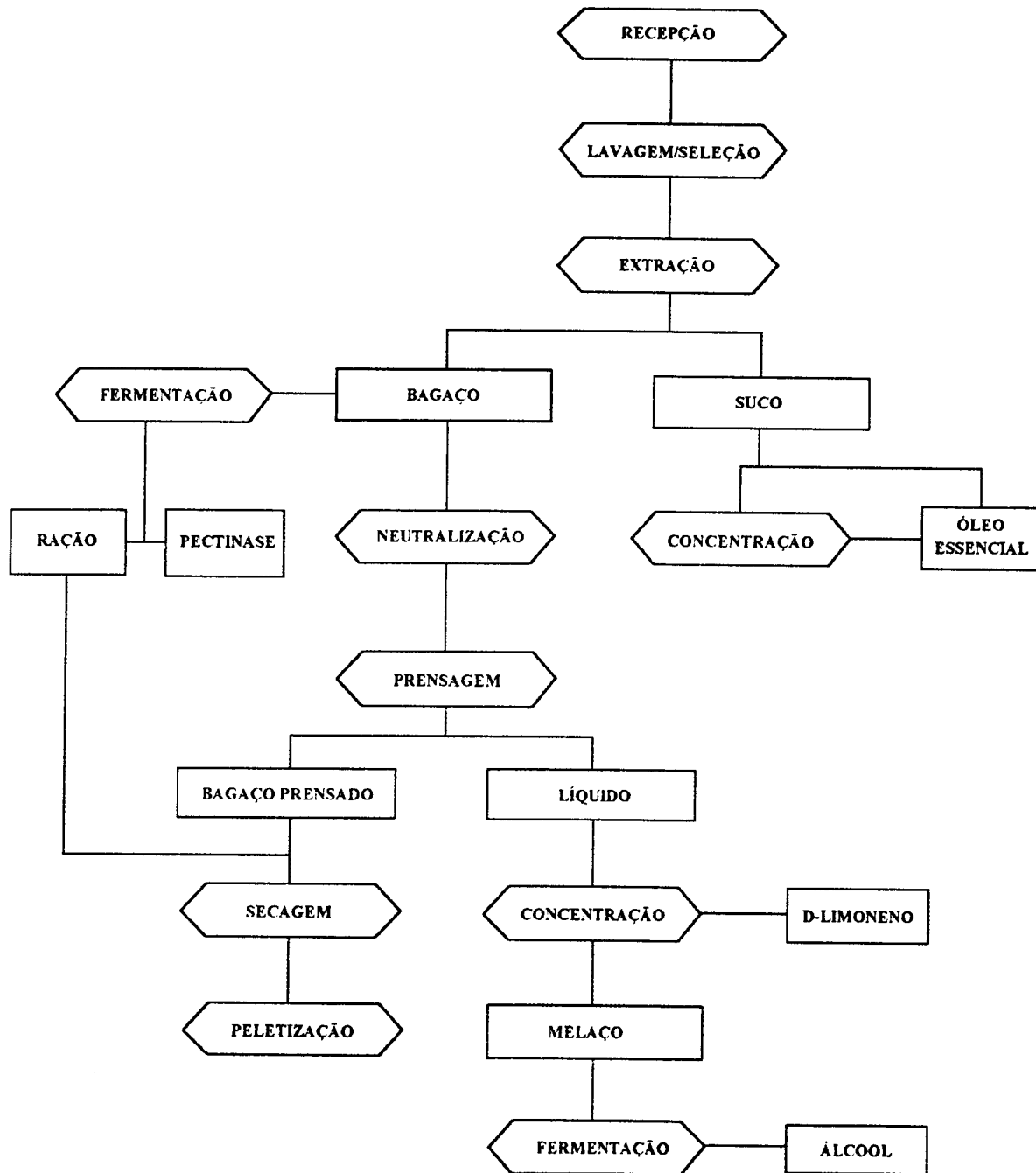
Anexo C:

Produção de pectinases fúngicas (Fonte: FOGARTY e WARD, 1974 - p. 104).



Anexo D:

Fluxograma do processamento de suco de laranja concentrado, modificado para a produção de enzimas pectinolíticas e ração animal (Fonte: MENEZES, 1989 -p. 168).



Anexo E:

Dados experimentais tabelados, empregados na construção dos gráficos apresentados.

TABELA E1: Efeito do tempo de fermentação sobre a produção de pectinase, ART e pH (Figura 4.1).

Tempo (horas)	Meio B			Meio A		
	Atividade Enzimática (UI/ml)	ART (mg/ml)	pH	Atividade Enzimática (UI/ml)	ART (mg/ml)	pH
0	ND	25,06	3,30	ND	0,33	3,31
48	$8,76 \times 10^{-2}$	39,22	3,33	$6,20 \times 10^{-4}$	0,38	3,29
96	$9,31 \times 10^{-2}$	17,12	4,31	$8,59 \times 10^{-3}$	0,54	3,55
144	$2,89 \times 10^{-2}$	3,76	4,31	$1,36 \times 10^{-2}$	0,58	5,90

(ND : não determinada)

(Resultados de análises em duplicatas).

TABELA E2: Efeito do tempo de fermentação sobre a atividade enzimática, a produtividade e o pH do meio de cultura (Figura 4.2).

Tempo de Fermentação (horas)	Atividade de Pectinase (UI/ml)	Produtividade (UI/ml)/dia	pH
0	0	0	4,60 (0,05)
24	0	0	4,54 (0,04)
48	$1,49 \times 10^{-2}$ ($5,3 \times 10^{-3}$)	$7,46 \times 10^{-3}$ ($2,6 \times 10^{-3}$)	4,05 (0,07)
72	$1,27 \times 10^{-1}$ ($9,9 \times 10^{-3}$)	$4,23 \times 10^{-2}$ ($3,3 \times 10^{-3}$)	4,02 (0,06)
96	$1,47 \times 10^{-1}$ ($2,2 \times 10^{-2}$)	$3,68 \times 10^{-2}$ ($5,4 \times 10^{-3}$)	3,98 (0,02)
120	$2,76 \times 10^{-1}$ ($5,3 \times 10^{-3}$)	$5,52 \times 10^{-2}$ ($1,1 \times 10^{-2}$)	3,93 (0,05)
144	$2,05 \times 10^{-1}$ ($1,3 \times 10^{-2}$)	$3,47 \times 10^{-2}$ ($2,2 \times 10^{-3}$)	3,98 (0,02)
168	$2,71 \times 10^{-1}$ ($7,8 \times 10^{-2}$)	$3,87 \times 10^{-2}$ ($1,1 \times 10^{-2}$)	4,01 (0,02)

(Os valores entre parenteses indicam os erros).

TABELA E3: Efeito da concentração de sais nutrientes sobre a atividade de pectinase (Figura 4.3).

Meios de Fermentação	Atividade de Pectinase		Erro	
	UI/g MFU	%	UI/g MFU	%
M6	$1,18 \times 10^{-1}$	59,42	$1,64 \times 10^{-2}$	13,80
M2	$2,00 \times 10^{-1}$	100,00	$6,32 \times 10^{-2}$	31,72
M7	$1,92 \times 10^{-1}$	96,52	$1,43 \times 10^{-2}$	7,44
M8	0	0	0	0

TABELA E4: Efeito da presença e tipo dos açúcares adicionados ao meio de cultura semi-sólido sobre a produção de pectinase por *Penicillium italicum* IZ1584 (Figura 4.4).

Tempo (dias)	Atividade de Pectinase (UI/g MFU)					
	Meio M2	erro	Meio M3	erro	Meio M4	erro
6	$2,00 \cdot 10^{-1}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$1,53 \cdot 10^{-1}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$9,88 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$
7	$6,52 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$	$2,60 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$7,64 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$
8	$3,20 \cdot 10^{-2}$	$4,3 \cdot 10^{-2}$	0	$4,3 \cdot 10^{-2}$	$9,52 \cdot 10^{-2}$	$7,6 \cdot 10^{-2}$
9	$7,44 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,03 \cdot 10^{-1}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$2,33 \cdot 10^{-1}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$
10	$3,72 \cdot 10^{-2}$	$4,3 \cdot 10^{-2}$	$3,72 \cdot 10^{-2}$	$4,3 \cdot 10^{-2}$	$7,08 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-2}$
15	$1,72 \cdot 10^{-1}$	$7,9 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$5,96 \cdot 10^{-2}$	$6,8 \cdot 10^{-2}$

TABELA E5: Variação do pH do meio semi-sólido em função do tempo de fermentação (Figura 4.5).

Tempo (dias)	pH					
	Meio M2	erro	Meio M3	erro	Meio M4	erro
6	3,70	0,05	3,66	0,05	3,62	0,05
7	4,18	0,05	4,14	0,05	4,02	0,05
8	4,01	0,05	4,09	0,05	4,04	0,05
9	4,02	0,05	4,00	0,05	3,98	0,05
10	4,10	0,04	4,01	0,02	3,95	0,01
15	3,90	0,07	3,58	0,09	3,68	0,08

TABELA E6: Efeito do pH sobre a atividade de pectinase (Figura 4.6).

pH	Atividade de Pectinase (UI/gMFU)		Atividade de Pectinase (%)*	
	Ensaio 5A	Ensaio 5B	Ensaio 5A	Ensaio 5B
3,0	$7,83 \cdot 10^{-2}$	$2,02 \cdot 10^{-2}$	52,0	8,8
4,0	$1,00 \cdot 10^{-1}$	$1,59 \cdot 10^{-1}$	66,5	68,8
5,0	$1,30 \cdot 10^{-1}$	$2,00 \cdot 10^{-1}$	86,6	86,1
6,0	$1,27 \cdot 10^{-1}$	$1,90 \cdot 10^{-1}$	84,5	82,5
7,0	$4,24 \cdot 10^{-2}$	$2,88 \cdot 10^{-2}$	28,2	12,5
8,0	ND	$2,31 \cdot 10^{-1}$	ND	100,0
8,7	$1,50 \cdot 10^{-1}$	ND	100,0	ND
9,0	ND	$4,04 \cdot 10^{-2}$	ND	17,5

(ND: não determinado)

(*): Porcentagem em relação à atividade máxima

TABELA E7: Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinase (Figura 4.7).

T (°C)	Atividade de Pectinase (UI/gMFU)		Atividade de Pectinase (%)*	
	Ensaio 5A	Ensaio 5B	Ensaio 5A	Ensaio 5B
30	$1,20 \cdot 10^{-1}$	$1,72 \cdot 10^{-1}$	87,4	41,5
35	$1,12 \cdot 10^{-1}$	$2,94 \cdot 10^{-1}$	81,7	70,8
40	$1,26 \cdot 10^{-1}$	$1,84 \cdot 10^{-1}$	91,4	44,4
45	$1,38 \cdot 10^{-1}$	$4,16 \cdot 10^{-1}$	100,0	100,0
50	$1,23 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-1}$	89,5	26,4

(*): Porcentagem em relação à atividade máxima