

**UNICAMP**

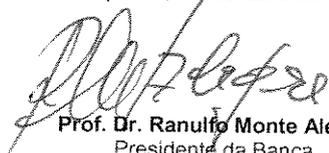
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES EM REATOR  
DE COLUNA POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE  
BAGAÇO DE LARANJA INDUSTRIALIZADO**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Márcia Luzia Rizzatto**, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de abril de 2004.

Campinas, 23 de abril de 2004.

  
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
Presidente da Banca

**Márcia Luzia Rizzatto**  
Engenheira de Alimentos  
Mestre em Engenharia de Alimentos

**Ranulfo Monte Alegre**  
Orientador

**Eleni Gomes**  
Co-orientadora

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

Campinas-SP  
2004

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÇÃO CIRCULANTE

2004.03.01.10000

UNIDADE	DR
Nº CHAMADA	UNICAMP R529e
V	EX
TOMBO BC	58727
PROC.	6.117.04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	24-06-09
Nº CPD	

CM00198442-B

BIB ID 317972

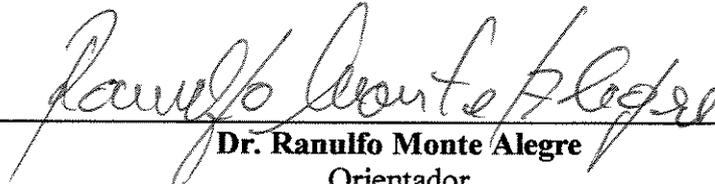
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

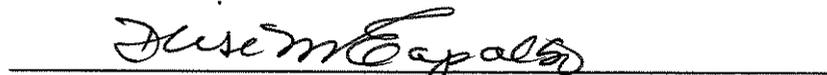
Rizzatto, Márcia Luzia  
M529e  
R529e Estudo da produção de pectinases em reator de coluna por fermentação semi-sólida de bagaço de laranja industrializado / Márcia Luzia Rizzato. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

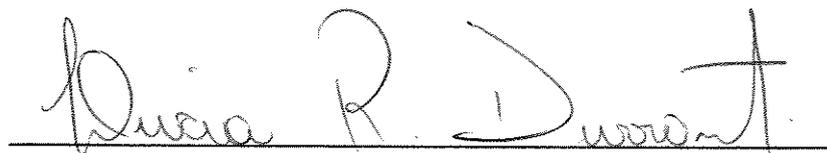
Orientador: Ranulfo Monte Alegre  
Co-orientador: Eleni Gomes  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Pectina. 2. Bagaço. 3. Fermentação semi-sólida.  
4. Penicillium. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Gomes, Eleni.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

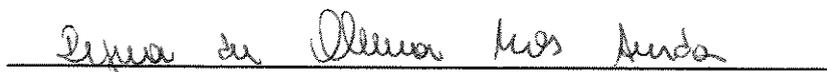
**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ranulfo Monte Alegre**  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Deise Maria Fontana Capalbo**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Lúcia Regina Durrant**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Yong Kun Park**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Regina de Oliveira Moraes de Arruda**  
Membro

\_\_\_\_\_  
**Dr. Romildo Martins Sampaio**  
Membro

\_\_\_\_\_  
**Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi**  
Membro

*Aos meus pais, Jocylla e Mário,  
Aos meus sogros, Martha e João,  
Pelo amor, carinho,  
por compartilharem os meus ideais  
e os alimentarem,  
e que jamais poderei ser suficientemente grata...*

*À minha pequena grande família,  
Ed, Carol e Mila, pela longa  
espera, amor, carinho, paciência  
e força...  
Vocês foram o maior estímulo  
para realização deste trabalho...  
Amo vocês...*

## *Agradecimentos*

*Ao professor Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela orientação, confiança, dedicação, incentivo, paciência e principalmente a amizade ao longo destes anos;*

*A professora Dra. Eleni Gomes, pela orientação, oportunidade, confiança, paciência e amizade;*

*Ao professor Dr. Roberto da Silva pela oportunidade e amizade;*

*Aos amigos de coração, Jean, Tânia, Denise e Caco, que sempre foram mais que simples amigos...*

*Aos amigos e colegas do laboratório, Dênis, Natí, Du, Ana Paula, Helô, Carla, Rodrigo, Marícy, Gisele, Tony, Tati, Caio, Simone, Solange, Ellen, Mariana, Márcia e Daniela... obrigada pelo carinho e amizade;*

*A banca examinadora pelas correções e sugestões, que muito contribuíram para este trabalho;*

*A Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudo e pelo apoio financeiro na compra dos equipamentos usados na realização deste trabalho;*

*A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que me proporcionou conhecimento e crescimento profissional;*

*A Universidade Estadual Paulista (IBILCE-UNESP), pela permissão para uso da biblioteca, do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada e demais dependências;*

*A indústria Cítrica CITROVITA - Agroindustrial Ltda - Catanduva - SP, representada pelo Engenheiro de Alimentos José Orlando Ferreira, pelo fornecimento da matéria-prima.*

## SUMÁRIO

I- LISTA DE FIGURAS.....	vii
II- LISTA DE TABELAS.....	x
III- NOMENCLATURA.....	xii
IV- RESUMO.....	xiii
V- SUMMARY.....	xv
VI- INTRODUÇÃO.....	xvii
VII- OBJETIVOS.....	xix

## Capítulo I: Revisão Bibliográfica

1. Fermentação.....	2
1.1. Tipos de fermentação.....	4
1.1.1. Fermentação submersa.....	4
1.1.2. Fermentação em meio semi-sólido.....	5
1.2. Biorreatores.....	10
1.2.1. Biorreatores para a FSS.....	10
1.3. Controles do processo.....	23
1.4. Condutividade térmica.....	26
1.5. Substâncias pécticas.....	30
1.5.1.1. Enzimas pectinolíticas.....	31
1.5.1.1.1. pectinaesterase.....	31
1.5.1.1.2. polimetilgalacturonase.....	32
1.5.1.1.3. poligalacturonase.....	32
1.5.1.1.4. polimetilgalacturonato liase.....	33
1.5.1.1.5. poligalacturonato liase.....	33
1.5.2. Produção de enzimas pectinolíticas.....	34
1.5.3. Aplicação de enzimas pectinolíticas.....	41

---

**Capítulo II: Fermentação semi-sólida de bagaço de laranja industrializado em embalagens de polipropileno para a produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584**

1. Introdução.....	46
2. Objetivos específicos.....	48
3. Material e métodos.....	49
3.1. Substrato para cultivo do fungo.....	49
3.2. Preparo do substrato.....	49
3.2.1. Moagem do bagaço de laranja.....	49
3.3. Caracterização do substrato.....	49
3.3.1. Granulometria.....	49
3.3.2. Umidade.....	50
3.3.3. Determinação do pH do bagaço de laranja e das amostras dos meios fermentados.....	50
3.4. Determinação de açúcares redutores (método de Somogyi-Nelson).....	50
3.4.1. Preparo dos reagentes.....	50
3.4.2. Dosagem dos açúcares.....	51
3.5. Microrganismo.....	51
3.6. Inóculo.....	52
3.7. Contagem de esporos e inoculação.....	52
3.8. Meios de cultura.....	52
3.9. FSS em embalagens de polipropileno.....	52
3.10. Extração da enzima a partir do material fermentado.....	53
3.11. Estudo do tempo da extração enzimática.....	53
3.12. Determinação das atividades enzimáticas.....	53
3.12.1. Determinação da atividade de exo-poligalacturonase.....	53
3.12.2. Determinação da atividade de endo-poligalacturonase.....	54
3.12.3. Determinação da atividade de de pectinaliase.....	54
3.12.4. Determinação da atividade de pectinaesterase.....	55
3.12.5. Determinação da atividade de xilanase.....	55

3.12.6.	Determinação da atividade de CMCase.....	55
3.12.7.	Determinação da atividade de amilase.....	56
3.12.8.	Determinação da atividade de protease.....	56
4.	Resultados e discussão.....	57
4.1.	Caracterização do substrato usado na FSS.....	57
4.2.	Estudo do tempo da reação enzimática.....	58
5.	Estudo da extração das enzimas.....	59
6.	Estudo da produção das enzimas pectinolíticas em embalagens de polipropileno.....	61
7.	Produção de outras enzimas despolimerizantes.....	64
8.	Conclusões.....	67

### **Capítulo III- Estudo da produção de pectinases em reator de coluna com diferentes umidades, aerações e densidades aparentes**

1.	Introdução.....	69
2.	Objetivos específicos.....	71
3.	Material e métodos.....	72
3.1.	Substrato para cultivo do fungo, caracterização e preparo.....	72
3.2.	Microrganismo.....	72
3.3.	FSS em reator de coluna.....	72
3.4.	Determinação da densidade aparente.....	75
3.5.	Determinação das atividades enzimáticas.....	75
4.	Resultados e discussão.....	76
4.1.	Estudo da produção das enzimas pectinolíticas em reator de coluna com diferentes umidades do meio.....	76
4.2.	Estudo da produção das enzimas pectinolíticas em reator de coluna com diferentes aerações.....	80
4.3.	Influência da densidade aparente do meio e cultivo.....	86
5.	Conclusões.....	90

---

**Capítulo IV- Estudo das variações de temperatura no reator de coluna,  
determinação da massa de CO<sub>2</sub> e condutividade térmica**

1. Introdução.....	92
2. Objetivos específicos.....	94
3. Material e métodos.....	95
3.1. Substrato para cultivo do fungo, caracterização e preparo.....	95
3.2. Microrganismo.....	95
3.3. SSF em reator de coluna.....	95
3.4. Medidas de temperatura.....	95
3.5. Condutividade térmica.....	95
3.6. Determinação das variações de temperatura do leito semi-sólido utilizando material inerte.....	97
3.7. Determinação da concentração celular nas fermentações semi- sólidas.....	97
3.8. CO <sub>2</sub> produzido.....	98
4. Resultados e discussão.....	100
4.1. Variações na temperatura do leito semi-sólido com e sem aeração....	100
4.2. Variações na temperatura do leito semi-sólido com diferentes densidades aparentes.....	102
4.3. Variações na temperatura do leito semi-sólido utilizando material inerte no meio de fermentação.....	107
5. Condutividade térmica do meio de fermentação.....	112
6. Determinação da massa de gás carbônico nas fermentações semi-sólidas...	115
7. Conclusões.....	117

**Capítulo V- Separação e caracterização físico-química das pectinases  
produzidas pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584**

1. Introdução.....	119
2. Objetivos específicos.....	126
3. Material e métodos.....	127
3.1. Microrganismo e substrato para cultivo.....	127
3.2. FSS em embalagens de polipropileno, extração das enzimas e determinação das atividades enzimáticas.....	127
3.3. Caracterização físico-química das pectinases.....	127
3.3.1. Caracterização da exo-poligalacturonase e pectinaliase.....	127
3.3.1a. Determinação do pH ótimo.....	127
3.3.1b. Determinação da temperatura ótima.....	128
3.3.2. Caracterização da atividade de endo-poligalacturonase.....	128
3.3.2a. Efeito do pH sobre atividade de endo-PG.....	128
3.3.2b. Efeito da temperatura sobre a atividade de endo-PG.....	128
3.3.3. Estabilidade frente a variações de pH.....	128
3.3.4. Estabilidade frente a variações de temperatura.....	129
3.4. Separação das frações enzimáticas.....	129
3.5. Caracterização físico-química das frações enzimáticas.....	129
4. Resultados e discussão.....	130
4.1. Caracterização físico-química das pectinases no extrato enzimático bruto.....	130
4.1.1. Determinação do pH e temperatura ótima das enzimas exo e endo- PG e pectinaliase.....	130
4.1.2. Determinação da estabilidade das enzimas frentes a variações de pH e temperatura .....	134
4.2. Separação das enzimas.....	140
4.3. Caracterização físico-química das frações coletadas.....	143
5. Conclusões.....	151

**Capítulo VI- Estudo da viabilidade do uso da solução enzimática bruta no processamento de sucos: aplicação de pectinases na extração de sucos de frutas e vegetais e avaliação das micotoxicoses produzidas pelo fungo**

1. Introdução.....	153
2. Objetivos específicos.....	161
3. Material e métodos.....	162
3.1. Aplicação da enzima na extração e clarificação de suco.....	162
3.2. Testes para quantificação de micotoxinas.....	164
3.2.1. Quantificação de aflatoxinas.....	164
3.2.2. Quantificação de ocratoxinas totais.....	166
4. Resultados e discussão.....	167
4.1. Testes de micotoxinas.....	167
4.2. Uso de enzimas na extração de sucos.....	168
4.2.1. Extração do suco de banana.....	169
4.3. Extração de suco de maçã.....	171
4.4. Extração de suco de cenoura.....	174
5. Conclusões.....	179
<b>VII. CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>180</b>
<b>VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>182</b>
<b>XIX- ANEXOS.....</b>	<b>210</b>
Anexo A – Ação das enzimas pectinolíticas.....	210
Anexo B - Fluxograma do processamento de suco de laranja concentrado, modificado para a produção de enzimas pectinolíticas e ração animal.....	211
Anexo C - Fluxograma da fabricação de pellets.....	212
Anexo D – Dados experimentais tabelados, empregados na construção dos gráficos apresentados.....	213

I- LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Fluxograma de produção de enzimas por FSS.....	7
<b>Figura 1.2.1.</b> Biorreatores de bandeja.....	13
<b>Figura 1.2.2.</b> Tanques circulares.....	13
<b>Figura 1.2.3.</b> Esteira rolante.....	14
<b>Figura 1.2.4.</b> Biorreator tubular horizontal com agitação.....	15
<b>Figura 1.2.5.</b> Biorreator horizontal.....	16
<b>Figura 1.2.6.</b> Biorreator de coluna.....	18
<b>Figura 1.2.7.</b> Embalagens plásticas.....	19
<b>Figura 1.2.8.</b> Tambor rotativo.....	21
<b>Figura 1.2.9.</b> Biorreator com sistema pneumático.....	22
<b>Figura 1.2.10.</b> Esquema adaptado do biorreator de tambor rotativo .....	22
<b>Figura 1.5.</b> Estrutura da molécula de pectina parcialmente esterificada.....	31
<b>Figura 1.5.1.1.</b> Mecanismo de ação da enzima pectinaesterase.....	32
<b>Figura 1.5.1.3.</b> Mecanismo de ação da enzima poligalacturonase.....	33
<b>Figura 1.5.1.5.</b> Mecanismo de ação da enzima pectinaliase.....	34
<b>Figura 4.2.</b> Hidrólise de pectina por pectinases de <i>Penicillium italicum</i> _IZ 1584.....	58
<b>Figura 6.1.</b> Atividade de pectinase de fermentação de bagaço de laranja por <i>P.</i> <i>italicum</i> em embalagens de polipropileno.....	61
<b>Figura 6.2.</b> Açúcares redutores totais da fermentação de bagaço de laranja por <i>P.</i> <i>italicum</i> em embalagens de polipropileno.....	62
<b>Figura 6.3.</b> pH da fermentação de bagaço de laranja por <i>P. italicum</i> em embalagens de polipropileno.....	63
<b>Figura 7.1.</b> Atividade de protease em fermentação de coluna de bagaço de laranja por <i>P. italicum</i> .....	65
<b>Figura 3.3.1.</b> Montagem experimental dos reatores de coluna em funcionamento.....	73
<b>Figura 3.3.2.</b> Esquema experimental proposto para o fermentador de coluna com leito fixo.....	74

<b>Figura 4.1.1.1.</b> Colunas de fermentação com bagaço de laranja de <i>P. italicum</i> com umidade de 50 e 55%.....	77
<b>Figura 4.1.1.</b> Atividade de Exo-PG de <i>P. italicum</i> em meios com diferentes umidades.....	77
<b>Figura 4.1.2.</b> Atividade de Endo-PG de <i>P. italicum</i> em meios com diferentes umidades.....	78
<b>Figura 4.1.3.</b> Atividade de pectinaliase de <i>P. italicum</i> em meios com diferentes umidades.....	79
<b>Figura 4.2.1.</b> Atividade de Exo-PG de <i>P. italicum</i> em reator de coluna.....	81
<b>Figura 4.2.2.</b> Atividade de Endo-PG de <i>P. italicum</i> em reator de coluna.....	82
<b>Figura 4.2.3.</b> Atividade de pectinaliase de <i>P. italicum</i> em reator de coluna.....	82
<b>Figura 4.2.4.</b> Açúcares redutores totais (ART) em meios fermentados em reator de coluna.....	85
<b>Figura 4.2.5.</b> pH dos meios fermentados por <i>P. italicum</i> em reator de coluna.....	86
<b>Figura 4.3.1.</b> Efeito da densidade aparente do meio sobre a atividade de exo-PG ao longo do processo fermentativo.....	88
<b>Figura 4.3.2.</b> Efeito da densidade aparente do meio sobre a atividade de endo-PG ao longo do processo fermentativo.....	88
<b>Figura 3.4.1.</b> Pontos de medições de temperatura do leite semi-sólido.....	96
<b>Figura 4.1.1.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido em função do tempo de fermentação para o ensaio sem aeração.....	101
<b>Figura 4.1.2.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido em função do tempo de fermentação para o ensaio com aeração.....	101
<b>Figura 4.2.1.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido em função da densidade aparente do meio (dap=522g/L).....	103
<b>Figura 4.2.2.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido em função da densidade aparente do meio (dap=570g/L).....	104
<b>Figura 4.2.3.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido em função da densidade aparente do meio (dap=665g/L).....	104

<b>Figura 4.2.4.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido em função da densidade aparente do meio (dap=760g/L).....	105
<b>Figura 4.3.1.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido utilizando material inerte no substrato (dap=430g/L).....	108
<b>Figura 4.3.2.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas do leite semi-sólido utilizando material inerte no substrato (dap=522g/L).....	108
<b>Figura 4.3.3.</b> Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte (dap=430g/L).....	110
<b>Figura 4.3.4.</b> Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte (dap=522g/L).....	110
<b>Figura 4.3.5.</b> Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte (dap=430g/L).....	111
<b>Figura 4.3.6.</b> Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte (dap=522g/L).....	111
<b>Figura 6.1.</b> Massa de CO <sub>2</sub> em função do tempo de fermentação.....	116
<b>Figura 4.1.1.1.</b> Efeito do pH sobre a atividade das enzimas.....	131
<b>Figura 4.1.1.2.</b> Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas.....	133
<b>Figura 4.1.2.1.</b> Estabilidade das enzimas frente à variações de pH.....	135
<b>Figura 4.1.2.2.</b> Estabilidade das atividades enzimáticas frente às variações da temperatura.....	138
<b>Figura 4.2.1.</b> Separação das frações enzimáticas em coluna gel.....	142
<b>Figura 4.3.1.</b> Efeito do pH sobre a atividade das enzimas.....	144
<b>Figura 4.3.2.</b> Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas.....	145
<b>Figura 4.3.3.</b> Estabilidade da enzima frente às variações de pH.....	147
<b>Figura 4.3.4.</b> Estabilidade da enzima frente às variações de temperaturas.....	148
<b>Figura 4.4.1.</b> Ação das pectinases sobre pectinas de diferentes graus de metoxilação.....	149
<b>Figura 3.2.1.</b> Fluxograma do processo de extração de suco.....	165

**II- LISTA DE TABELAS**

**Tabela B1.** Hidrólise de pectina por pectinases de *P. italicum* IZ 1584 para estudo do tempo de reação enzimática.....213

**Tabela B2.** Atividade de pectinases em embalagens de polipropileno.....213

**Tabela B3.** Açúcares redutores totais e pH da fermentação em embalagens de polipropileno.....214

**Tabela B4.** Atividade de exo-PG em reator de coluna em meios com diferentes umidades.....214

**Tabela B5.** . Atividade de endo-PG em reator de coluna em meios com diferentes umidades.....215

**Tabela B6.** . Atividade de pectinálise em reator de coluna em meios com diferentes umidades.....215

**Tabela B7.** Atividade de exo-PG em reator de coluna em meios com diferentes taxas de aeração.....216

**Tabela B8.** Atividade de endo-PG em reator de coluna em meios com diferentes taxas de aeração.....216

**Tabela B9.** Atividade de pectinálise em reator de coluna em meios com diferentes taxas de aeração.....217

**Tabela B10.** Açúcares redutores totais da fermentação em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.....217

**Tabela B11.** pH da fermentação em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.....218

**Tabela B12.** Efeito da densidade aparente do meio sobre a atividade de exo-PG ao longo do processo fermentativo.....218

**Tabela B13.** Efeito da densidade aparente do meio sobre a atividade de endo-PG ao longo do processo fermentativo.....218

**Tabela B14.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação sem aeração (dap = 430g/L).....219

**Tabela B15.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 430g/L).....219

<b>Tabela B16.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 522g/L).....	220
<b>Tabela B17.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 570g/L).....	220
<b>Tabela B18.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 665g/L).....	221
<b>Tabela B19.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 760g/L).....	221
<b>Tabela B20.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido utilizando material inerte como substrato (dap = 430g/L).....	222
<b>Tabela B21.</b> Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido utilizando material inerte como substrato (dap = 522g/L).....	222
<b>Tabela B22.</b> Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 430g/L).....	223
<b>Tabela B23.</b> Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 522g/L).....	223
<b>Tabela B24.</b> Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 430g/L).....	223
<b>Tabela B25.</b> Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 522g/L).....	223
<b>Tabela B26.</b> Efeito do pH sobre atividade da enzima exo-PG.....	224
<b>Tabela B27.</b> Efeito do pH sobre atividade da enzima pectinaliase.....	224
<b>Tabela B28.</b> Efeito do pH sobre atividade da enzima endo-PG.....	225
<b>Tabela B29.</b> Efeito da temperatura sobre atividade das enzimas.....	225
<b>Tabela B30.</b> Estabilidade das enzimas frente às variações de pH.....	225
<b>Tabela B31.</b> Estabilidade das enzimas frente às variações de temperatura.....	226
<b>Tabela B32.</b> Efeito do pH sobre a atividade da enzima fracionada exo-PG.....	226
<b>Tabela B33.</b> Efeito do pH sobre a atividade da enzima fracionada endo-PG.....	226
<b>Tabela B34.</b> Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima fracionada exo-PG.....	227
<b>Tabela B35.</b> Estabilidade das enzimas frente às variações de pH .....	227

### III- NOMENCLATURA

**Q** = fluxo de calor (W)

**I** = intensidade da corrente na sonda (A)

**R** = resistência da sonda ( $\Omega$ )

**K** = condutividade térmica (W/m/K ou cal/cm/s/K)

**M<sub>CO2</sub>** = massa de gás carbônico liberada durante a fermentação (g CO<sub>2</sub>)

**V<sub>NaOH</sub>** = volume de hidróxido de sódio usado para coleta do CO<sub>2</sub> liberado na fermentação

**N<sub>i</sub>** = normalidade inicial da solução

**N** = normalidade da solução de NaOH no tempo de amostragem

**SSF** = fermentação semi-sólida

**SmF** = fermentação submersa

#### IV- RESUMO

Atualmente, as vantagens do uso de enzimas na indústria de alimentos têm sido amplamente reconhecidas. As enzimas pectinolíticas têm assumido importante papel nas indústrias cítricas. Quando aplicadas na extração de sucos aumentam a quantidade de suco livre, atuam na quebra da emulsão de óleo essencial que se forma após a extração do suco, aumentam a remoção de pigmentos e ácidos orgânicos e inibem a geleificação do suco concentrado. Na produção de vinhos e sucos de frutas são também muito utilizadas, pois diminuem a viscosidade, o tempo de processamento nos vários estágios e o gasto de energia para aquecimento, prensagem e centrifugação e diminuem a temperatura de processo evitando alterações indesejadas na cor e no sabor devido a caramelização, além de atuar na estabilização e clarificação de sucos de frutas e na eliminação de substâncias pécticas de alimentos vegetais. Por outro lado, na extração de óleos vegetais, as pectinases degradam componentes de parede presentes na polpa, facilitando a extração, enquanto na indústria têxtil, possibilitam a degradação da pectina e a conseqüente separação das fibras de celulose da parede celular no tratamento de fibras vegetais brutas. Dada a larga aplicação dessas enzimas, a produção das mesmas através de processos que utilizem meios de baixo custo e de fácil acesso é uma meta a ser alcançada, quando visa-se a produção comercial das mesmas. O presente trabalho teve como objetivos estudar a produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço de laranja industrializado em reator de coluna, identificar, quantificar, separar e aplicar as pectinases produzidas durante o processo fermentativo e quantificar possíveis micotoxinas produzidas pelo microrganismo utilizado. No estudo da extração da enzima o solvente tampão tris-HCl pH 8,0 foi o que obteve maior capacidade de extração quando comparado a água destilada, tampão acetato-fosfato pH 4,0 e NaCl 2%. O tempo de 60 minutos de agitação foi o mais eficiente no processo de extração da enzima. O fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 produziu proteases o que veio a confirmar o aumento do pH e o decréscimo da atividade enzimática durante o processo fermentativo. Na caracterização físico-química do

extrato enzimático bruto, as pectinases exo e endo-PG e pectinaliase possuem pH ótimo de 5.5, 7.0 e 8.5, respectivamente, e temperatura ótima de 40°C para exo-PG e 50°C para endo-PG e pectinaliase. O processo de separação das enzimas exo e endo-PG mostrou-se efetivo, com bons valores de rendimento quando comparado com os valores do extrato enzimático bruto (87% para exo e 86,7% para endo-PG). Na especificidade pelo substrato, pode-se observar que os dados obtidos sugeriram que a enzima em estudo é uma polimetilgalacturonase. Os níveis de aflatoxinas encontrados no substrato fermentado e não fermentado indicaram que o fungo em estudo não é produtor de micotoxinas. Na extração de sucos, a análise estatística, através do teste de Tukey, mostrou que os volumes de suco de banana extraídos com o uso da enzima, sob condições de pH, temperatura e tempo de extração não foram estatisticamente diferentes entre si, a 5% de probabilidade. Para o suco de maçã, os maiores volumes médios de suco extraído foram obtidos quando a enzima estava presente no tratamento aplicado, principalmente nas condições otimizadas e para o suco de cenoura, não houve diferenças significativa entre os volumes médios de suco extraído nas diferentes condições. Os meios com umidade 55% e 60% mostraram-se eficientes para uma boa umidificação dos meios de fermentação e a aeração foi de extrema importância na remoção do calor no interior da coluna e na produção das enzimas durante o processo de fermentação. Quanto maior a densidade do meio de fermentação, menor é o crescimento microbiano e conseqüentemente menor a atividade enzimática.

Palavras chave: pectinases; *Penicillium italicum*; bagaço; laranja; reator de coluna; fermentação semi-sólida.

## V- SUMMARY

Nowadays, advantages of using enzymes in food industry had been widely recognized. Pectinolytic enzymes had been important in citrus industries; when applied on juice extraction they increase free juice amount; act in breaking of essential oil emulsion that takes place after juice extraction; they increase pigments and organic acids removal and inhibit gelatinization of concentrated juice. On wine production and fruit juices they are utilized a lot, because their properties of reducing both viscosity, and processing time on several stages and heating energy, pressing and centrifugal consumption; they reduce process temperature that avoids color and flavor undesirable changes due to caramelization. They act also on stabilization and clarification of fruit juices and elimination of peptic substances in vegetable food. On the other hand, in vegetable oil extraction, pectinases degrade wall components that are in the pulp, favoring extraction while on textile industry, make possible pectin degradation and separation of cellulosic fibers from this wide application, their production through process that uses low cost and easy access is a goal to be reached, when it is necessary large scale production. This work had as an objective studying pectinases production by semi-solid fermentation with industrialized orange bagasse in column reactor, to identify, quantify, separate and apply produced pectinases during fermentation process and quantify micotoxins perhaps produced by utilized microorganism. On extraction study of enzyme the buffer tris-HCl pH 8.0 showed more extraction than distilled water, buffer acetate-phosphate pH 4.0 and NaCl 2%. Agitation time of 60 minutes was the most efficient on extraction process of enzyme. *Penicillium italicum* IZ 1584 produced proteases that confirmed increase during fermentative process. In physical chemical characterization of enzymatic extract, pectinases exo and endo-PG and PL had optimum pH of 5.5, 7.0 and 8.5, respectively and optimum temperature of 40°C for exo-PG and 50°C for endo-PG and PL. Separation process of exo and endo-PG enzymes showed to be effective with good yield values (87% for exo and 86,7% for endo-PG). In specificity by substrate it can be observed that obtained data suggested that studied enzyme is a polimethylgalacturonase. Aflatoxin levels found on fermented and non-fermented

substrate indicated that fungus is not a micotoxins producer. In juices extraction, statistical analysis through Tukey test showed that banana juice volumes extracted using enzyme under pH, temperature and extraction time were not different statistically between them at 5% of probability. For apple juice, greater average volumes extracted were obtained when enzyme was present on applied treatment, mainly in optimized conditions and for carrot juice showed that there were not significant differences between average volumes of extracted juices on different conditions. Medium with 55% and 60% of humidity showed to be efficient for a optimum humidification of fermentation medium and aeration was extremely important on heat removal from inside of column and enzyme production during fermentation process. Higher densities of fermentation medium lower microorganism growth and consequently lower enzymatic activity.

**Keywords:** pectinases, *Penicilium italicum*, bagasse, orange, column reactor, semi-solid fermentation.

## VI. INTRODUÇÃO

O aproveitamento integral e racional de recursos agrícolas disponíveis representa importante aspecto para alcance da auto-suficiência alimentar e tecnológica. Uma das alternativas de maior viabilidade para se chegar a esse objetivo pode ser encontrada na biotecnologia.

A grande maioria das indústrias, produzem além do produto final, um grande volume de resíduos e subprodutos. O mercado brasileiro possui enorme disponibilidade de resíduos e subprodutos agroindustriais, destacando-se as indústrias processadoras de sucos cítricos, onde cerca de 40% da matéria prima processada (laranja) se transforma em bagaço, as destilarias e refinarias que geram melação, os amiláceos (batata, milho, mandioca, banana e seus resíduos) , bagacilhos e outros materiais lignocelulósicos residuais da cana.

Esses subprodutos agroindustriais apresentam características comuns:

- são recursos naturais renováveis;
- sua produção depende de outra atividade produtiva (geralmente são subprodutos de disponibilidade concentrada geograficamente);
- são produzidos em grande quantidade e constituem um problema sanitário e ecológico em sua região;
- sempre foram utilizados para enriquecimento de solos ou como ração animal, gerando lucros, benefícios às empresas e à sociedade.

Por outro lado, a utilização desses resíduos evita que os mesmos sejam descartados e gerem problemas de poluição ambiental. Hoje, esses materiais podem também ser aproveitados para obtenção de outros produtos de alto valor comercial. É o caso das enzimas, que atualmente representam no mercado mundial um valor estimado de US\$ 1,5 bilhão ao ano, sendo que no Brasil este valor gira ao redor de US\$ 35 milhões, de acordo com a Carteira de Comércio Exterior do Banco do Brasil.

As enzimas são catalizadores orgânicos produzidos pelas células vivas, que aceleram as reações químicas em seus processos vitais. Uma vez sintetizada por uma célula, uma enzima poderá atuar independentemente dessa célula, se condições apropriadas forem mantidas. Uma das características de destaque das enzimas é sua especificidade pelo substrato. As propriedades adicionais das enzimas são a atividade em baixa concentração, a rapidez de ação e a não-toxicidade. O conhecimento das características dessas substâncias aumentou sobremaneira, a ponto de muitas enzimas terem seus mecanismos de ação e suas estruturas perfeitamente determinadas; em conseqüência, esses catalizadores têm sido empregados na síntese orgânica, em procedimentos analíticos e em processos industriais dos setores farmacêuticos, alimentícios, têxtil, de couro, papel-celulose e de minérios.

Várias enzimas como pectinases, celulasas, hemicelulasas, amilases e arabinases têm sido produzidas industrialmente em diversos países. A maioria, por processo fermentativo. As enzimas pectinolíticas exercem importante papel, pois atuam nas indústrias processadoras de suco aumentando a quantidade de suco livre, a estabilização e clarificação de sucos, na fabricação de vinhos, alimentos infantis, extração de óleos vegetais, fermentação de chá, café, cacau e fumo, e na indústria têxtil no tratamento de fibras brutas vegetais.

Uma vez que o interesse pela FSS tem crescido significativamente em nível mundial, acompanhada pela crescente importância industrial das enzimas, o uso deste tipo de fermentação, associado ao aproveitamento de substratos facilmente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, pode tornar-se economicamente vantajosa. Para os países subdesenvolvidos ou em fase de crescimento, onde a crise atual e a globalização da economia mundial não permitem acompanhar a crescente evolução biotecnológica, os processos de SSF apresentam uma oportunidade ímpar a ser considerada.

## VII- OBJETIVOS

### 1. Gerais

Estudar a produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 em fermentação semi-sólida, utilizando como substrato bagaço de laranja industrializado.

### 2. Específicos

1. Estudar a produção de pectinases em embalagens de polipropileno por *Penicillium italicum* IZ 1584, utilizando como substrato bagaço de laranja industrializado;
2. Definir o melhor método para a extração do extrato enzimático bruto em relação ao tempo de agitação e solvente utilizado, além de avaliar as melhores condições para determinação das atividades de pectinases;
3. Estudar a produção de outras enzimas durante o processo fermentativo, pelo fungo em questão;
4. Estudar a produção de pectinases em reator de coluna com umidades diferentes do meio de cultivo;
5. Estudar a produção de pectinases com diferentes aerações na coluna de fermentação;
6. Estudar a influência da densidades aparente no meio de cultivo.
7. Estudar as variações de temperatura no leito semi-sólido com diferentes densidades aparentes;
8. Estudar a variação de temperatura usando material inerte;

9. Determinar a condutividade térmica do material fermentado;
10. Separar as frações de pectinases produzidas pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, através de cromatografia em gel sephadex;
11. Caracterizar físico-quimicamente a solução enzimática bruta e as frações das enzimas separadas por cromatografia;
12. Testar a especificidade das frações separadas em relação ao substrato;
13. Estudar a produção de Aflatoxinas e Ocratoxinas pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 durante o processo fermentativo para a obtenção das pectinases;
14. Avaliar a viabilidade do uso da enzima bruta na extração do suco de frutas e vegetais.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. Fermentação**

A fermentação é utilizada há muito tempo na biotecnologia e é entendida no sentido lato, não apenas como foi inicialmente proposto por Pasteur, na obtenção de álcool, como sinônimo de borbulhamento, mas como um processo no qual mudanças bioquímicas ocorrem num substrato orgânico, através da ação de catalisadores (enzimas), obtidas de microrganismos *in vivo* ou *in vitro* (ATKINSON, 1984).

Atualmente, a técnica de fermentação para a produção de enzimas está bem desenvolvida. Várias enzimas como pectinases, celulasas, hemicelulasas, amilases e arabinases têm sido produzidas industrialmente em diversos países. A maioria por processo fermentativo, visto que uma variedade considerável de microrganismos podem produzi-las (WHITAKER, 1990).

Vários tipos de substratos são utilizados em Fermentação semi-sólida; em geral, são compostos de resíduos ou subprodutos agro-industriais os quais apresentam as seguintes características:

- são recursos naturais renováveis;
- sua produção depende de outra atividade produtiva (geralmente são subprodutos de disponibilidade concentrada geograficamente);
- são produzidos em grande quantidade e constituem um problema sanitário e ecológico para a região que os geram;
- alguns necessitam de um prévio tratamento físico ou químico para a FSS, que lhes dêem novas características físicas que facilitem o desenvolvimento do microrganismo (GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA-TORRES, 1992).

Os substratos são divididos de acordo com a fonte de carbono utilizada pelos microrganismos: os que contêm amido (arroz, milho, mandioca, farelo de trigo, resíduos de batata e de banana); os que contêm celulose e lignocelulose (palha de trigo, de arroz e de milho, farelo de trigo, polpa de beterraba) e os que contêm

açúcares solúveis (polpa de café, casca de manga e de banana, polpa de uva, beterraba doce) (MITCHELL e LONSANE, 1992; RAIMBAULT et al., 1998).

Segundo MITCHELL et al. (2000) os substratos que contêm amido precisam passar por um tratamento térmico para que o amido sofra gelatinização, transformando-o em uma forma mais solúvel de modo que o microrganismo possa degradá-lo, a monômeros de açúcar que serão assimiláveis. Os substratos lignocelulósicos podem ser submetidos a tratamentos prévios utilizando vapor, ácidos ou álcalis, para que ocorra a quebra da celulose e lignina de modo a torná-los mais acessíveis ao microrganismo. Os substratos que contêm açúcares solúveis, geralmente são mais facilmente utilizáveis pelo microrganismo.

Vários tipos de substratos têm sido usados em FSS como, farelo de trigo e soja (CASTILHO et al., 1999 e 2000; SING et al., 1999; SILVA et al., 2003); bagaço de cana (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999; KANSOH et al., 1999); resíduo de maçã (BEROVIC e OSTROVERSNIK, 1997); resíduo de morango (ZHENG e SHETTY, 2000); casca de café (SOARES et al., 2000; PANDEY et al., 2000); farelo de mandioca (RABALHO et al., 2002), bagaço de laranja (RIZZATTO et al., 1999; SILVA et al., 2003); casca de banana e de manga e tegumento de milho (SILVA, 2003).

Alguns substratos podem ser utilizados como suporte inerte em SSF que podem ser naturais (bagaço de cana, de milho, casca de arroz, entre outros) ou sintéticos (espuma de poliuretano, amberlite, perlite, vermiculite, grânulos de barro). Esses substratos são utilizados no intuito de ajudar a resolver problemas que ocorrem durante o processo de FSS como a compactação do meio, dissipação do calor gerado pelo microrganismo, etc.

OOIJKAAS et al. (2000) utilizaram substratos inertes sintéticos em conjunto com substratos definidos em FSS e observaram maior controle dos processos e

do monitoramento das variáveis estudadas (pH, aw, temperatura, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) e concluíram que os suportes inertes são fatores cruciais para o sucesso da FSS.

## **1.1. Tipos de Fermentação**

Existem dois métodos principais de fermentação, sendo ambos eficientes: a fermentação em meio líquido ou submersa (FSm) e a fermentação em meio semi-sólido ou em estado sólido (FSS).

### **1.1.1. Fermentação submersa (FSm)**

FSm é aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. Segundo MITCHELL et al. (2000) na SmF a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado e apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento e controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, tem-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação do produto/substrato.

Segundo FOGARTY e WARD (1974), na FSm 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 com grande número de componentes como misturas de carboidratos, materiais nitrogenados e minerais, que devem ser adequados para a produção das 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.

### **1.1.2. Fermentação em meio semi-sólido (FSS)**

A FSS pode ser definida como aquela cujo substrato é um material úmido, não suspenso em água e sem escoamento aquoso (GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES, 1992). O processo FSS é mostrado no esquema genérico de produção de enzimas na Figura 1.1.

Os autores CANNEL e MOO-YOUNG (1980), GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA-TORRES (1992) e LONSANE et al. (1992), definiram o processo FSS como o crescimento de microrganismo em materiais sólidos umedecidos na ausência ou perto da ausência de água livre. MITCHELL et al. (1992) e PANDEY et al. (1999) por sua vez, definiram como fermentação em “substrato sólido”, os processos nos quais o substrato é usado como fonte de carbono e energia, ocorrendo na ausência ou quase ausência de água livre e fermentação em “estado sólido” como um processo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, usando substrato natural ou inerte como suporte sólido. Esses autores citam algumas vantagens e desvantagens da fermentação semi-sólida quando comparada com a fermentação submersa.

#### **Vantagens:**

1. elevada concentração de produto. Como não existe grande quantidade de água, a atividade por grama de material é muito elevada e leva a uma série de vantagens:

- O espaço ocupado pelos equipamentos de fermentação é reduzido quando comparado com o rendimento do produto;
- Volume reduzido ou mesmo inexistente de contaminantes ambientais;
- Dispensa em certos casos de etapa de extração e concentração do produto, podendo ser utilizado diretamente ou após secagem prévia do substrato da fermentação;

- Frequentemente a extração da atividade pode ser feita com água, dispensando o uso de solventes;
- Emprego de volumes reduzidos ou solução extratora;

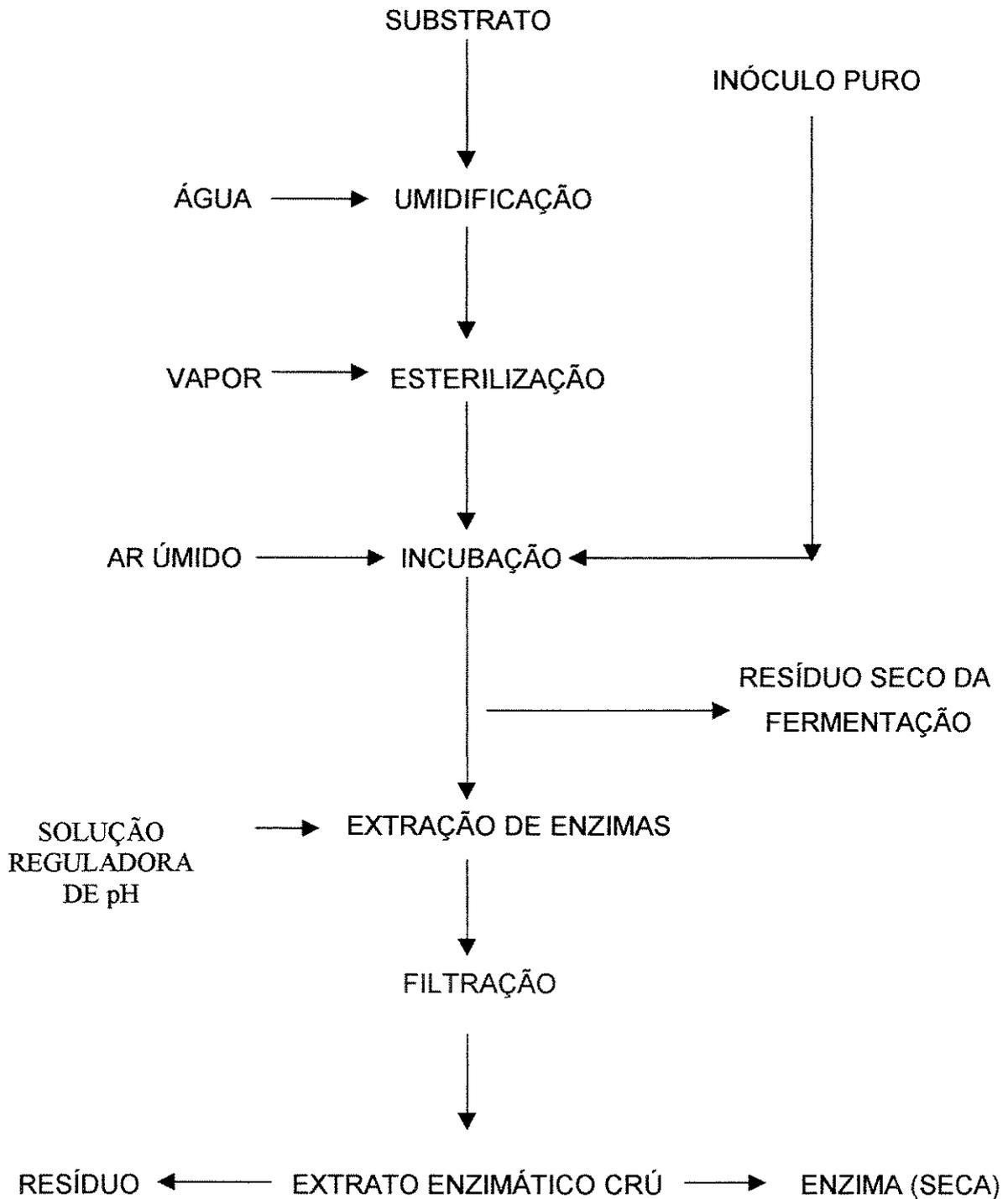
2. O reduzido teor de umidade, diminui o perigo de contaminantes bacterianos, podendo assim, dispensar em alguns casos da esterilização do substrato;

3. Composição dos meios é simples, utilizando matérias-primas de baixo custo;
4. Baixas taxas de aeração;
5. Tecnologia pouco sofisticada;
6. Investimentos reduzidos;
7. Processo extrativo simplificado;
8. Baixa taxa de poluição.

#### **Desvantagens:**

1. Os microrganismos passíveis de serem utilizados no processo se limitam geralmente aos que são capazes de crescer com baixos teores de umidade;
2. Necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo;
3. O controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade, crescimento celular, etc.) é mais difícil de se realizar;
4. Pouca disponibilidade de dados de engenharia. O Japão possui a tecnologia mais avançada, porém, dados relevantes são difíceis de obter e geralmente são de caráter confidencial.

Segundo PANDEY et al. (2000), a análise crítica em várias literaturas mostram que o processo da FSS possui vantagem no bioprocessos e na produção de vários produtos. Ficou estabelecido que em alguns casos como das enzimas, compostos bioativos, etc, a produção foi maior no processo de FSS comparado com o processo de FSm. Assim, o desenvolvimento da aplicação de FSS vem sendo utilizada em várias áreas como a de biorremediação e biodegradação de



**FIGURA 1.1.** Fluxograma de produção de enzimas por FSS.

(GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES, 1992).

compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos tóxicos agro-industrial e desenvolvimento de produtos biologicamente ativos como metabólitos secundários, incluindo antibióticos e outras drogas, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, etc.

Alguns autores compararam a produção de alcalóides por *Claviceps fusiformis* pelo método de FSm e por FSS e observaram aumento na produção de 3,9 vezes, quando usada a FSS (HERNANDEZ et al., 1992). SHAH et al. (1991) estudaram a produção de  $\alpha$ -amilase de *A. oryzae* SCM por FSm e FSS, chegaram a conclusão de que a FSS é mais econômica .

ACUÑA-ARGÜELLES et al. (1995) estudaram a produção e propriedades de três atividades pectinolíticas de *A. niger* cultivado em FSm e FSS, concluindo que com a FSS os valores de produtividade foram maiores. Consideraram ainda, que a atividade de pectinaliase foi inibida quando o processo fermentativo foi o submerso.

Por outro lado, TARAGANO e PILOSOF (1999) estudaram a produção de pectinases de *A. niger* em FSS e FSm, utilizando farelo de trigo e extrato aquoso de farelo de trigo como substrato, respectivamente. Concluíram que a produção de PG foi 5 vezes maior quando usado o processo de FSm comparado com o processo de FSS e a atividade de PL foi 3 vezes maior em FSS do que em FSm e a atividade de pectinaesterase apresentou cerca de 30% maior em FSS.

De acordo com HESSELTINE (1972); RAIMBAULT e ALAZARD (1980); MOO-YOUNG et al. (1983) e ORIOL et al., (1988), na FSS o microrganismo é inoculado em um substrato aparentemente sólido e úmido. Os níveis ideais de umidade dos substratos, geralmente, vão desde 12% até 80%. Os níveis acima de 80% podem até ser melhores para o processo, mas isso dependerá da capacidade de retenção de água do material utilizado como substrato. Em

contrapartida, em FSm a atividade de água é alta e o meio, quando diluído, pode alcançar um volume grande comparado com a FSS. A quantidade de água em FSm chega a constituir cerca de 90-99% da massa total do material a ser fermentado (MITCHELL et al., 2000).

HESSELTINE (1972) descreve as características das FSS quando o sistema é submetido à agitação. Segundo este autor, é preciso ter circulação de ar entre as partículas do substrato sólido para que o material fermentado não se agregue durante a fermentação e a umidade se mantenha em níveis baixos, ao redor de 28%. Para que a aeração não seja comprometida, o volume de substrato tem que ser pequeno em relação a capacidade volumétrica do reator. As vantagens por ele citadas, da FSS são: o espaço ocupado pelo equipamento é pequeno e não necessita de tanques para a produção de inóculos, uma vez que os esporos são usados diretamente devido a baixa umidade do meio de cultivo; não ocorre contaminação da área de fermentação e as condições de crescimento de fungos são parecidas com as de seu habitat natural. Normalmente, maiores taxas de produção são obtidas em FSS em relação a FSm, e a extração do produto desejado é feita no próprio biorreator, pela adição direta do solvente.

Os maiores problemas relacionados à utilização de substratos sólidos são: a necessidade de se produzir o inóculo em grandes quantidades, com esporos fúngicos com capacidade de germinação rápida e uniformidade acima de 95%; 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.

A fermentação semi-sólida (FSS) vem sendo empregada predominantemente em países orientais, usando substratos facilmente disponíveis

e de baixo custo; é tida como o mais antigo processo fermentativo usado pelo homem.

## **1.2. Biorreatores**

Biorreator é um recipiente que tem como objetivos conter o leito de substrato, impedir a liberação do organismo para as vizinhanças do biorreator, impedir ou minimizar a entrada de contaminantes e manter as condições ótimas para crescimento e formação de produtos em todos os lugares dentro do biorreator e durante a fermentação inteira (MITCHELL et al., 2002).

Segundo RAGHAVARAO et al. (2003) um biorreator é o coração em um processo de fermentação, onde o substrato úmido em condições apropriadas é capaz de ser convertido no produto desejado.

### **1.2.1. Biorreatores para a FSS**

A escolha do biorreator para a realização de uma fermentação deve considerar os objetivos da mesma. Entre eles estão a análise econômica dos custos iniciais e operacionais do processo, a possibilidade de monitoramento e controle de diversos parâmetros como o controle eficiente da aeração, agitação e remoção do calor metabólico gerado, se houver necessidade, e a manipulação simplificada do sistema (carga/ recarga, limpeza, manutenção). A construção do biorreator precisa ser de forma a evitar a entrada de contaminantes, o material utilizado precisa ser resistente contra corrosão e não tóxico ao microrganismo. Para a ampliação de escala do reator, deve-se verificar, primeiramente, em escala de laboratório, se os objetivos foram alcançados e observar parâmetros que em pequena escala não são compatíveis com a escala industrial, como os efeitos da espessura e compactação do substrato, da taxa de aeração, da transferência de oxigênio, da temperatura, umidade e da dissipação do calor (CANNEL e MOO-YOUNG, 1980; DURAND et al., 1988; RAGHAVARAO et al., 2003).

Vários tipos de biorreatores têm sido usado em processos de FSS ao longo de décadas, incluindo tambores rotativos, leitos com gás-sólido fluidizado, leito fixo, agitados e rotativos e vários outros tipos de biorreatores (MITCHELL et al., 2000; RAGHAVARAO et al., 2003).

**Reatores de vidro:** Os primeiros reatores que devem ser citados são os de vidro, comumente utilizados em laboratório. Os frascos Erlenmeyers são os primeiros a serem lembrados devido a facilidade de manuseio durante as pesquisas. Frascos de Fernbach também são bastante utilizados, inclusive em nível industrial, para a produção de esporos, devido à ampla área superficial entre o substrato e a atmosfera que o mesmo fornece para o desenvolvimento dos microrganismos. Garrafas de cultura embora excelentes para o início de uma pesquisa, deixam a desejar quando se pensa em uma ampliação de escala do processo (DEL BIANCHI et al., 2001).

Estudos de FSS foram realizados por MAIORANO (1990) em frascos de Erlenmeyer de 250 mL para a produção da enzima pectinase por cultivo de *Aspergillus*. Nestes estudos, foi utilizado farelo de trigo como substrato, complementado por uma solução alcalina, em dois tipos de sistemas de fermentação, descontínuo e de corte. Foi verificado pelo autor, que no sistema, com fração de corte igual a 75%, quando esta operação foi realizada após certo tempo de fermentação, foi obtido a atividade máxima de pectinase, 11% maior que o valor obtido com o sistema descontínuo.

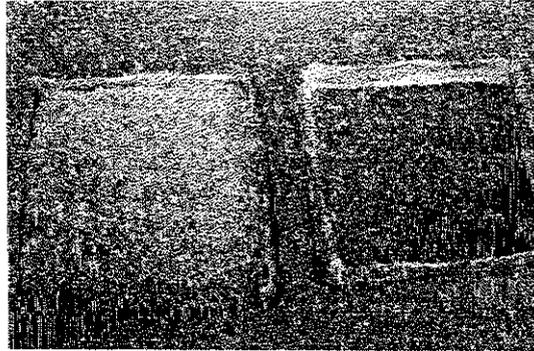
SOARES et al. (1999) estudaram a produção de pectinases de *Bacillus sp* em FSS em frascos de Erlenmeyer em diferentes temperaturas de incubação (28, 30, 35 e 40°C) usando farelo de trigo como substrato. Obtiveram alta atividade de PG (40U/g), endo-PG (15,5 U/g) e PL (1000 U/g).

ZHENG e SHETTY (2000) utilizaram frascos de Erlenmeyer para a produção de poligalacturonases de *Lentinus edodes* usando resíduos de frutas como substrato em FSS. Após 40 dias de fermentação, obtiveram valores máximos de 29,4 U/g e 14,0 U/g com resíduo de maçã e morango, respectivamente.

**Bandejas** (Figura 1.2.1): Estes tipos de fermentadores são caracterizados como sendo de alto custo, devido a necessidade de uma grande área operacional e ao fato do substrato não poder ser esterilizado no fermentador. São os tipos mais simples e as bandejas podem ser metálicas, de plástico ou de madeira. Devem conter o substrato e ter perfurações para permitir que ocorra aeração através da superfície inferior do meio de cultivo. Estas bandejas são colocadas umas sobre as outras e normalmente arranjadas mantendo-se uma certa distância entre elas (PANDEY, 1991). Para a disposição das bandejas, deve-se ter um local apropriado para o desenvolvimento da fermentação. Podem ser utilizadas simplesmente salas com estantes, fazendo-se uso de ar natural ou aeração forçada, desde que haja o controle da temperatura e umidade (DEL BIANCHI et al., 2001).

GHILDYAL et al. (1981) usaram meio semi-sólido em bandejas perfuradas para produção em larga escala de enzimas pectinolíticas em meio umidificado, utilizando farelo de trigo como substrato e esporos de *A. carbonarius* CFTRI 1048. As bandejas foram colocadas na câmara de um fermentador comercial, cuja capacidade era de 96 bandejas. O equipamento contava com controle de umidade, temperatura e circulação de ar. As fermentações foram conduzidas por 20 a 21 horas, sob 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 de 25°C até 45,2°C devido à geração de calor durante a fermentação, resultando na diminuição de cerca de 12% na produção da enzima.

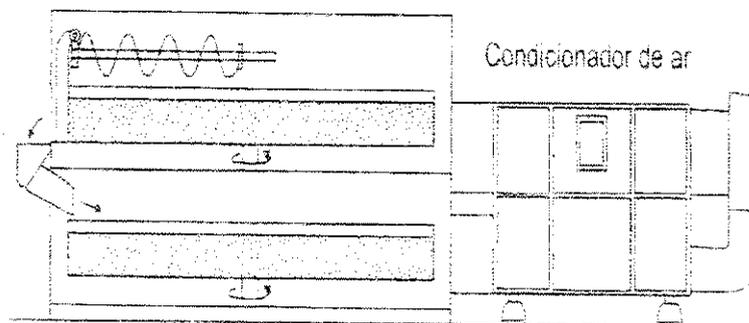
Outros autores utilizaram bandejas para produção de glucoamilase e protease alcalina de *Aspergillus niger* em FSS utilizando como substrato farelo de trigo, GHILDYAL et al. (1992 e 1993) e MALATHI e CHAKRABORTY et al. (1991), respectivamente.



**Figura 1.2.1.** Biorreatores de bandeja.

( Fonte: DEL BIANCHI, 2001)

**Tanques circulares** (Figura 1.2.2.): Este fermentador descrito por TOYAMA (1976) como um equipamento em cultura estática em nível industrial, denominado produtor de “Koji” automático estacionário, consiste de dois tanques rotatórios de 7m de diâmetro, dotados de um agitador helicoidal, dentro

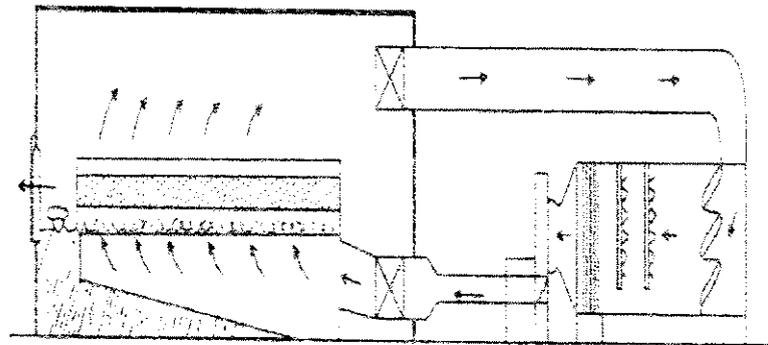


**Figura 1.2.2.** Tanques circulares

( Fonte: DEL BIANCHI, 2001)

de uma câmara de condições controladas. Neste equipamento podem ser processados, a cada batelada, cerca de 2 a 3 toneladas de meio de cultura, com alimentação, esterilização, inoculação e retirada do produto realizados automaticamente (DEL BIANCHI et al., 2001).

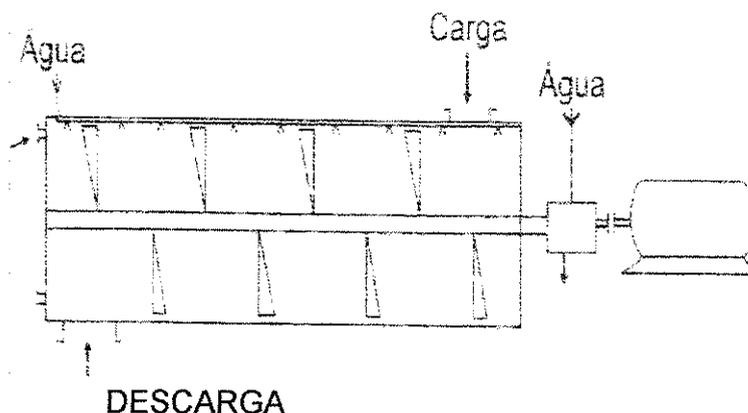
**Esteira rolante** (Figura 1.2.3): Segundo THIEMANN (1985) este sistema é uma variante do fermentador de bandejas. As etapas de inoculação e incubação do material esterilizado são realizadas em grandes esteiras de fundo perfurado por onde circula ar úmido. De acordo com as necessidades de cada produto, pode ser realizada também uma agitação ocasional.



**Figura 1.2.3. Esteira rolante**  
( Fonte: DEL BIANCHI, 2001)

**Tubular Horizontal** (Figura 1.2.4): Neste equipamento, o crescimento do microrganismo é considerado melhor e mais uniforme do que nos fermentadores de bandejas (PANDEY, 1991). No entanto, é também considerado de custo elevado para o volume de material produzido e apresenta dificuldade de ampliação de escala do processo e da manutenção da integridade do micélio devido a agitação do sistema. Neste fermentador, o substrato é esterilizado e resfriado diretamente no tambor e sua agitação pode ser realizada pela própria rotação do reator ou por agitador central contendo número variável de pás. A aeração da massa é realizada pela passagem de ar esterilizado e umidificado

através do reator, objetivando também o controle da temperatura interna (THIEMANN, 1985).



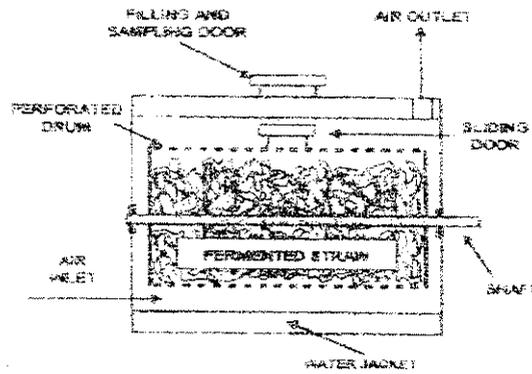
**Figura 1.2.4.** Biorreator tubular horizontal com agitação  
( Fonte: DEL BIANCHI, 2001)

BEROVIC e LOGAR-DERENCIN (1993) utilizaram fermentador do tipo tubular horizontal (tambor) para a produção de pectinase de *A. niger* P26 tendo como substrato a pectina de maçã. A esterilização do substrato foi realizada no próprio fermentador, mas houve problemas de aglomeração das partículas.

BEROVIC e OSTROVERSNIK (1997) estudaram a produção de pectinases de *A. niger* em SSF utilizando polpa de maçã combinada com farelo de trigo e farinha de soja como substrato em reator horizontal. O resultado preliminar da otimização do substrato em escala experimental foi transferido para o reator. Foram estudados vários parâmetros como inoculação, influência da agitação, aeração, temperatura e umidade.

KALOGERIS et al. (1999) construíram um biorreator horizontal para produção de celulase e hemicelulase utilizando microrganismo termofílico em FSS. O biorreor (Figura 1.2.5) consistia de um tubo cilíndrico perfurado (poros de  $1 \text{ mm}^2$ ), com diâmetro de 0,15 m, altura de 0,59 m e capacidade de 10 L e possuía também portas especiais para o carregamento, inoculação, amostragem e

descarte. A temperatura era controlada por circulação de água (coluna encamisada), medida através de termopares e era injetado ar umidificado no interior da coluna.



**Figura 1.2.5.** Biorreator horizontal  
(Fonte: KALOGERIS et al., 1999)

**Tubular vertical:** Também denominado fermentador tipo coluna, tem sido o reator utilizado em pesquisas quando se deseja obter o controle do processo. Segundo SAUCEDO-CASTANEDA et al. (1992), os fermentadores de coluna consistem de tubos de plástico ou de vidro colocados na vertical, com um leito fixo de substrato, com tampa de ambos os lados. Estes fermentadores podem ter encamisamento externo para controle de temperatura através da circulação de água. Alternativamente (e em pequena escala), o controle de temperatura pode ser feito pela manutenção do conjunto em uma atmosfera controlada. Os autores afirmaram também, que esses tipos de fermentadores são os que mais se adaptam ao aumento de escala ("scale-up") e ao controle de processos. O cultivo de *Schwanniomyces castellii* CBS2863, por eles realizado em fermentador tipo coluna com leito de 900 mm de altura, permitiu que com o controle da taxa de aeração do sistema o gradiente de biomassa, formado a diferentes alturas do leito, fosse eliminado.

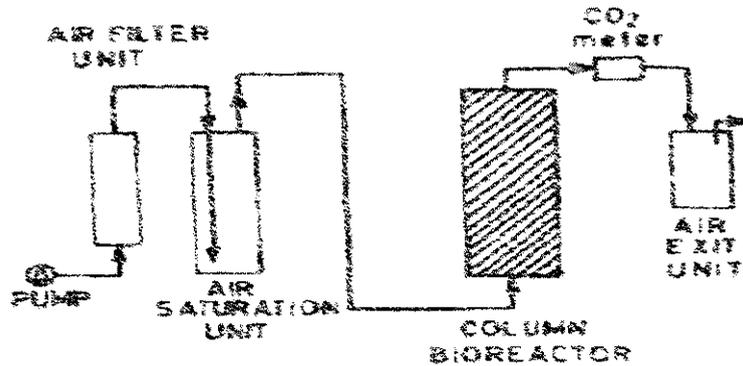
Este tipo de reator, apresenta como vantagens, espaço reduzido, rapidez de carga e descarga e uma relação volume total/volume útil próximo a 1. Como desvantagem, apresenta a compactação da massa não uniforme ao longo do equipamento. Dentro desta categoria, e visando superar algumas das desvantagens apresentadas, inclui-se também o denominado reator de leito fluidizado ar-sólido, que fornece um melhor controle de temperatura, de umidade e maior homogeneidade do sistema (ROUSSOS et al., 1991; SILMAN et al., 1979).

Segundo SAUCEDO-CASTAÑEDA et al. (1992) encontra-se nesta categoria o reator *Zymotis*, projetado pela ORSTOM-França, que possui capacidade para receber até 21 Kg de meio.

COSTA (1996) produziu amiloglicosidase por *A. niger* NRRL 3122 em FSS de farelo de arroz, usando reator tipo coluna, encamisada, por onde circulou água para manter a temperatura de fermentação. Concluiu que o aumento de aeração exerceu um efeito positivo, tanto sobre a atividade enzimática, quanto sobre a produtividade do processo e que o valor de 60 mL ar. h<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup> meio foi suficiente para uma boa oxigenação do meio e ótimo para a produção da enzima. A densidade aparente do meio em intervalo entre 586 e 858 g/L mostrou não ter influência sobre a atividade enzimática e produtividade e valores acima e abaixo desta faixa influenciaram negativamente. A aeração utilizada mostrou-se insuficiente para a remoção do calor metabólico gerado durante o processo fermentativo, sendo observado que a troca de calor se realizou de duas maneiras diferentes: radialmente a contribuição maior para o fluxo de calor foi dada pelo mecanismo de condução e na direção axial por convecção foi observado um maior gradiente radial da temperatura.

PANDEY et al. (1996) desenvolveram dois biorreatores de coluna com alturas iguais (27,0 cm) e diâmetros internos diferentes (4,5 e 2,5 cm) para produção de glucoamilase por *Aspergillus niger* em FSS (Figura 1.2.6). Os

biorreatores foram empacotados com substrato em diferentes alturas (4,5; 9,0; 18,0 e 22,5 cm), onde observaram maior valor de atividade enzimática no biorreator com substrato na altura de 18,0 cm nos dois biorreatores com diâmetros internos diferentes.



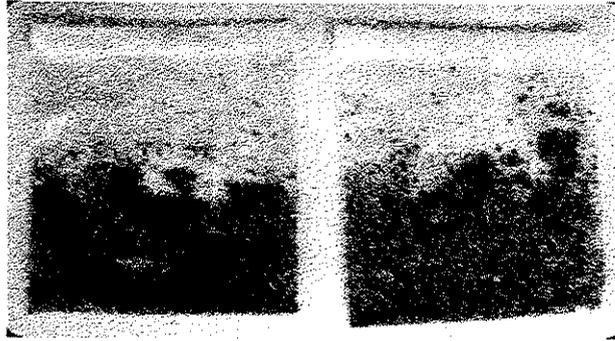
**Figura 1.2.6.** Biorreator de coluna

(Fonte: PANDEY et al., 1996)

STUART et al. (1998) estudaram a produção de proteína de *A. oryzae* ACM 4669 em fermentador vertical, utilizando farelo de trigo como substrato. O fermentador possuía capacidade de 18,7 L, 850 cm de comprimento e 190 cm de altura. Os autores observaram a importância do estudo da transferência de calor e massa e a rotação no sistema de fermentação semi-sólida.

**Embalagens plásticas** (Figura 1.2.7): Geralmente essas embalagens são sacos flexíveis de polipropileno que suportam as temperaturas de esterilização e são permeáveis ao oxigênio e ao gás carbônico. São de baixo custo e de fácil manuseio, permitem uma boa homogeneização do material e reduzem as perdas de amostras, principalmente por quebra de frascos (COSTA, 1996).

HENNIES (1996) estudou a produção de pectinase por *P. italicum* IZ 1584 através de FSS de bagaço de laranja industrialmente processado, em embalagens de polipropileno. Concluiu que esse fungo foi capaz de produzir a enzima



**Figura 1.2.7.** Embalagens plásticas

(Fonte: RIZZATTO, 1999)

pectinase extracelularmente, sendo esta atividade incrementada quando a sacarose estava presente no meio de cultivo. Observou também, que a produção de pectinase por FSS, com bagaço de laranja lavado, mostrou-se ser mais efetiva frente ao bagaço de laranja não lavado e apresentou maior atividade e produtividade quando o período de fermentação foi de 120 horas. 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 variação de temperatura de fermentação de 28°C para 34°C apresentou pequena influência sobre os níveis de pectinase produzidos, sendo que os melhores resultados foram obtidos a temperatura de 34°C.

RIZZATTO et al. (1999) estudou a produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 através de FSS em embalagens de polipropileno. Foi utilizado como substrato bagaço de laranja industrializado adicionado de sais em solução aquosa, com umidade final ajustada para 75%. Em todos os meios estudados, concluiu que o fungo *P. italicum* IZ 1584 foi o melhor produtor de pectinases comparativamente ao *A. niger*.

SILVA et al. (2003) estudaram a produção de pectinases pelo fungo *Penicillium veridicatum* RFC3 em embalagens de polipropileno, usando como

fonte de carbono farelo de trigo e bagaço de laranja 1:1 (p/p) com umidades de 70 e 80% durante 14 dias. Observaram que as enzimas exo-PG e PL foram produzidas em maior quantidade a 80% enquanto que a endo-PG teve sua produção favorecida a 70% de umidade.

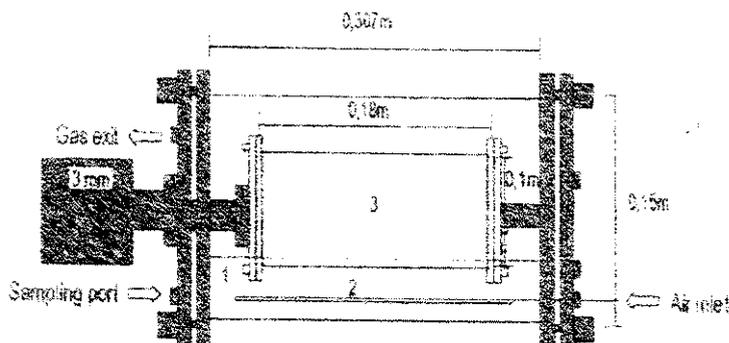
Foi estudada a produção de pectinases por *Curvularia inaequalis* através da variação de umidade em embalagens de polipropileno utilizando como substrato farelo de trigo e bagaço de laranja 1:1 (p/p). Foi observado uma melhor produção de pectinases no substrato hidratado com 70% de umidade (TOKUYOSHI et al., 2002).

Vários pesquisadores têm construído diversos tipos de biorreatores para produção de enzimas e outros produtos em FSS. Recentemente, um novo e eficiente biorreator, denominado de PLAFRACTOR, foi estudado por vários pesquisadores. Esse biorreator possui controle computadorizado, onde todas as etapas de operações, incluindo esterilização do substrato, inoculação, controle das condições de fermentação, como também, a extração do produto do substrato e posterior esterilização deste. Este biorreator é utilizado para a produção de citotóxicos farmacêuticos como ácidos micofenólicos e lovastatina (RAGHAVARAO et al., 2003).

Segundo este mesmo autor, outro biorreator também tem sido estudado recentemente, onde consiste de um tambor rotativo na forma de "balde", com agitação do substrato, onde as operações de esterilização e inoculação do substrato é automatizado. A agitação ocorre de forma lenta assegurando danos mínimos no rompimento das hifas e ajudando também na eliminação dos gradientes de temperatura. A aeração forçada com ar úmido ajuda na transferência de oxigênio e na manutenção da umidade do substrato.

DOMINGUEZ et al. (2001) construíram um biorreator de tambor rotativo para produção enzimas lignolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* em FSS

utilizando suporte inerte (Figura 1.2.8). O biorreator consiste de uma malha cilíndrica, com rotação lenta (3 rpm) e de um tubo cilíndrico contendo o meio de cultura. A malha cilíndrica contém cubos de esponja de nylon onde carregam junto o fungo utilizado. Conforme a malha gira, ela leva consigo o fungo com o substrato onde este consegue entrar em contato com o ar na parte superior da coluna, permitindo a transferência de oxigênio.

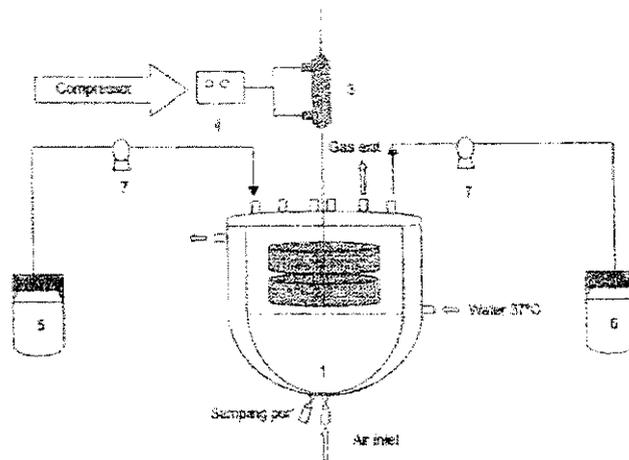


**Figura 1.2.8.** Tambor rotativo

(Fonte: DOMINGUEZ et al., 2001)

COUTO et al. (2002) estudaram a produção de enzimas lignolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 em FSS, onde utilizaram cubos de esponja de nylon como suporte. Para esse estudo, utilizaram o biorreator, como mostra a Figura 1.2.9, que consiste de um recipiente cilíndrico (22,5 cm de altura e 23,2 cm de diâmetro interno), com de duas cestas de malha de arame (3,0 cm de altura, 6,5 cm de diâmetro e malha de 1,5 cm), preenchidas com cubos de esponja de nylon inoculadas com o microrganismo e colocadas no interior do reator. Estas foram movimentadas para cima e para baixo por meio de sistema pneumático, permanecendo 90 segundos na parte exterior e 10 segundos na parte interior do meio.

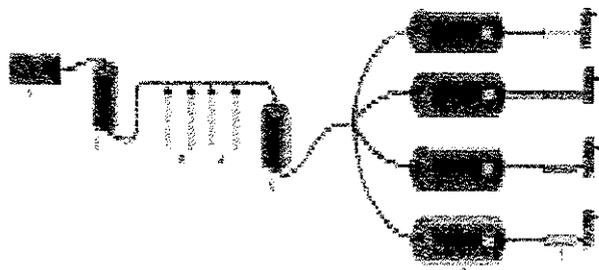
COLLA et al. (2003) estudaram a produção de exo-PG e amiloglicosidase em biorreatores de tambor rotativo utilizados por SARAIVA et al. (1999) (Figura



**Figura 1.2.9.** Biorreator com sistema pneumático.

(Fonte: COUTO et al., 2002)

1.2.10). Os biorreatores eram construídos em aço inox, com 200 mm de diâmetro e 500 mm de comprimento, equipados com filtros de ar, chicanas, umidificador e coluna de remoção de água, rotâmetro, motor e redutor, trocador de calor e compressor. A quantidade de substrato utilizada em cada biorreator foi 2000 g.



**Figura 1.2.10:** Esquema adaptado do biorreator de tambor rotativo (1- Compressor, 2- Filtro de ar de entrada, 3- Umidificadores, 4- Colunas de remoção de gotas, 5- Aquecedor, 6- Tambores rotativos, 7- Filtro de saída de ar e 8- Rotômetros).

(Fonte: COLLA et al., 2003)

### **1.3. Controle do processo**

Em todo processo fermentativo, o controle de determinados parâmetros faz-se necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. O controle da umidade, da temperatura, pH do meio, velocidade e frequência de agitação, condições de transferência de oxigênio e de nutrientes, características do substrato, além das características e estimativa de crescimento microbiano e da automação do processo, são os parâmetros mais freqüentemente analisados (RAMANA MURTHY et al., 1993).

**Umidade:** O teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influenciam o sucesso de uma FSS. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter no início e ao longo da fermentação (LONSANE, 1985). Um substrato apropriadamente umedecido deve ter um filme superficial de água, visando facilitar a dissolução e a transferência de massa de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas devem existir canais que permitam a difusão de gases e a dissipação de calor (TENDERGY, 1985). O teor de umidade na FSS pode variar entre 18 e 85%. Geralmente o crescimento microbiano é afetado pela umidade contida no substrato sólido (SATO e SUDO, 1999).

**Atividade de água:** Este parâmetro fornece a quantidade de água não ligada disponível aos microrganismos. Ela é definida como a razão entre a pressão de equilíbrio de vapor de água do substrato em relação à água pura, numa mesma temperatura. A atividade de água ( $a_w$ ) influencia o desenvolvimento microbiano e os processos bioquímicos. Assim, cada microrganismo tem um nível de  $a_w$  mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas. Em geral, os fungos possuem uma  $a_w$  mínima de 0,7, enquanto que para as leveduras o valor situa-se em 0,8 e para as bactérias 0,9 (RAMANA MURTHY et al., 1993).

**Temperatura:** Devido as atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos, metabolismo e a formação de produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação. Isto pode ser efetuado com a passagem de ar através do meio de cultura, com o controle da temperatura da sala onde ocorre a fermentação, ou através de sistema de camisas em torno do fermentador com circulação de água refrigerante (LONSANE, 1985). O controle da temperatura no substrato é muito importante na FSS para o crescimento e produção de enzimas ou metabólitos que usualmente são sensíveis à temperatura (SATO e SUDO, 1999; MITCHELL et al., 2000).

**pH:** Cada microrganismo possui um pH ótimo de crescimento e se esse pH estiver fora da faixa de tolerância do microrganismo, este não irá crescer, prejudicando assim o bom desempenho do processo de fermentação. Por isso, o controle do pH durante a FSS se faz necessário; embora seja um dos mais críticos, dificilmente será conseguido devido a heterogeneidade e a consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (LONSANE, 1985; BELLON-MAUREL et al., 2003).

**Aeração:** Na maioria dos processos para bom rendimento e fermentação rápida em substrato sólido, é necessário o uso de uma grande área superficial do meio de cultura, na qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar. Na maior parte dos processos, tanto em nível laboratorial como em nível industrial, a oxigenação do meio é realizada pela introdução de ar esterilizado sob pressão no equipamento de fermentação. Dependendo do valor da taxa de aeração introduzida, pode ser ocasionada uma perda de umidade devido a

exaustão do ar, provocando uma secagem não desejada do substrato. Assim sendo, torna-se sempre necessário, nestes casos, a presença de umidificadores de ar antes da introdução do mesmo no reator. Há diferentes maneiras para se obter uma melhor movimentação do ar através do substrato, permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio; utilização de material poroso, granulado ou fibroso; uso de uma pequena espessura de uma camada de substrato; utilização de bandejas perfuradas ou reatores com fundo composto por uma tela de arame; agitação do substrato ou ainda pela introdução de ar forçado estéril dentro do reator. Esta quantidade de ar estéril a ser introduzida no processo fermentativo vai depender da natureza dos microrganismos, da quantidade de calor metabólico a ser dissipada do processo, da espessura da camada do substrato, da quantidade de CO<sub>2</sub> e outros metabólitos voláteis eliminados e da necessidade de oxigênio para a síntese dos produtos (LONSANE, et al., 1985; MARSH et al., 1998; SAJC et al., 2000).

**Agitação:** O emprego da agitação em um processo em estado sólido pode vir a fornecer uma melhor homogeneização, quanto a distribuição do inóculo e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer tanto a transferência gasosa pela exposição de partículas de substrato à atmosfera do fermentador, como a troca de calor dentro do meio (LONSANE, 1985). A agitação, porém, devido a fragmentação mecânica de micélios, pode interferir na formação dos esporos e no desenvolvimento natural do microrganismo (SILMAN, 1980). Pode causar também a compactação do meio e a danificação das hifas (THIEMANN, 1985). Durante o processo de "scale-up", a meta é reproduzir os produtos em larga escala nas condições ótimas encontradas em uma escala menor. Com aumento de volume de substrato no reator e longos tempos de agitação, podem interferir no controle do processo (SAJC et al., 2000; OOIJKAAS et al., 2000).

**Estimativa e característica de crescimento:** A sequência de crescimento microbiano em meio de cultura, em condições ótimas, envolve a germinação nas primeiras horas, seguida de um aumento gradual de temperatura devido ao início

das atividades metabólicas, uma taxa crescente das atividades metabólicas, fases estacionária e de declínio. A duração de cada etapa vai depender das condições de fermentação e do microrganismo empregado (LONSANE, 1985). O fungo filamentosos tem a capacidade de penetrar nos espaços intracelulares por meios mecânicos ou enzimáticos, pela fixação das hifas na superfície do substrato e posterior ramificação intensa e penetração na parede celular do substrato e pela atuação de enzimas extracelulares produzidas e excretadas pelo microrganismo. Portanto, é muito difícil estimar diretamente a biomassa microbiana no processo em estado sólido, assim como, separar em muitos casos o micélio do substrato (MOO-YOUNG et al., 1983).

**Extração de produtos:** Para extração de enzimas extracelulares, são utilizados diluentes, como água corrente, água destilada, solução diluída de sais ou solução tampão. A extração envolve contato com o sólido fermentado e com a solução de lixívia. O produto que se encontra na parte sólida é transferido para a fase líquida de lixiviamento através da extrapartícula da solução de lixívia. A solubilidade da enzima depende do pH da solução de lixívia, pois este tem que ter valor de pH longe do ponto isoelétrico da enzima (MITCHELL et al., 1999).

#### **1.4. Condutividade Térmica**

A condutividade térmica é uma propriedade física do material que descreve a taxa na qual o fluxo de calor passa através dele, sob a influência de uma diferença de temperatura (PARK, et. al. 1997).

De acordo com outros autores, a condutividade térmica de um material é a medida de sua capacidade de conduzir calor (SWEAT, 1986) e, varia com a composição química, estado, estrutura física e temperatura do corpo em questão. HALLIDAY et. al. (1995) de acordo com o pelo British Standards Institution, define a condutividade térmica, como:

$$q = \frac{K \cdot A \cdot (T_1 - T_2)}{L} \quad (1.4.1)$$

onde,

q = quantidade de calor (W);

k = condutividade térmica (W/m.K);

A = área de troca térmica (m<sup>2</sup>);

T = temperatura (K);

L = espessura do material (m)

Segundo PARK et. al. (1997) a condutividade térmica de materiais sólidos varia com o material, temperatura e teor de umidade. Os materiais biológicos não são tão homogêneos e por variarem sua estrutura celular, composição química e conteúdo de ar, é esperada uma variação na condutividade térmica destes materiais. Os valores numéricos da condutividade térmica podem variar de acordo com a composição química, estrutura física, estado, densidade, temperatura e teor de umidade do material. Para materiais biológicos, a dependência da condutividade térmica com a estrutura celular, densidade e umidade é maior do que a da temperatura.

Métodos empíricos de determinação da condutividade têm sido empregados e um grande número de dados para produtos alimentícios fora determinados por meio de equações. Estas expressões apresentam sérios inconvenientes, desde variação na composição química, estrutura interna e outros fatores que podem afetar as propriedades térmicas dos produtos.

SHARMA e THOMPSON (1973) afirmam existir muitos métodos para avaliar as propriedades térmicas de grãos e sementes úmidos, os quais fornecem aproximações grosseiras dos resultados.

O método mais usual atualmente adotado é o método do estado transiente. É adotado devido a grande vantagem de requerer menor tempo de teste. Algumas dificuldades associadas a este método são: medida da temperatura, localização dos termopares e transferência de calor convectiva em medições de propriedades térmicas de materiais granulares (PARK et. al. 1999).

Segundo KAZARIAN et al. (1965), MOHSEIN, (1980) e CHANG e LAI (1980) dentre os variados métodos de determinação de estado transiente, o método da Fonte Linear de Aquecimento é um dos mais relatados para materiais granulares e consiste em aquecer através de uma fonte linear de calor a potência constante, colocada ao longo de eixo central à massa de grãos, inicialmente com temperatura uniforme.

O procedimento usual consiste em se aplicar um fluxo de calor constante da fonte para o material, inicialmente em equilíbrio, e medir a elevação de temperatura em algum ponto do material.

De um ponto a fonte linear, a elevação de temperatura  $T_1$  e  $T_2$  pode ser expressa por:

$$T_2 - T_1 = \frac{Q}{4\pi k} \ln \left( \frac{t}{t_1} \right) \quad (1.4.2)$$

onde,

$T_1$  e  $T_2$  = temperaturas no tempo  $t$  e  $t_1$ ;

$Q$  = potência da fonte linear;

$K$  = condutividade térmica.

Se a temperatura, tempo e potência da fonte são conhecidas, a condutividade térmica pode ser calculada a partir desta equação (SHARMA e THOMPSON, 1973; CHANG et. al. 1986).

Esta teoria baseia-se na relação entre a condutividade térmica e a elevação da temperatura em um meio infinito homogêneo devido a fonte linear de aquecimento de potência constante. A determinação das propriedades térmicas de partículas pequenas, como grãos, devido ao seu tamanho e forma irregular, é feita assumindo-se contornos regulares como os de um cubo, cilindro ou esfera. A razão para isso é facilitar a utilização das equações de transferência de calor derivadas destas formas especiais (SHARMA e THOMPSON, 1973; FREIRE, 1981).

Graficando  $\Delta T$  contra  $\ln t$ , obtém-se uma reta, cuja inclinação "b" é dada por:

$$b = \frac{Q}{4 \cdot \pi \cdot K} \quad (1.4.3)$$

Várias fontes de erro com relação às equações são destacadas quando se refere à fuga da idealidade do modelo proposto, em função da amostra real não ser infinita e da sonda também não ser infinita no comprimento e nem nula no diâmetro (COSTA, 1996).

HALLIDAY et. al. (1995) afirmaram com relação ao tamanho da amostra, que a mesma deve ser grande o suficiente para que o aumento de temperatura na superfície externa seja desprezível. MURR (1992) relata que amostras cilíndricas com a relação comprimento/diâmetro maior ou igual a 4 mostram-se ideais.

Vários autores em função de possibilidades de erros, utilizaram-se de um fator de calibração, característico para cada sonda, onde a calibração foi realizada com um material de condutividade conhecida, normalmente água, adicionada de ágar ou glicerina, pois desta forma não há convecção e o valor da condutividade térmica não se altera (PARK et. al., 1997; COSTA, 1996; HALLIDAY et. al., 1995; SWEAT, 1986; CANEDO et. al., 1975).

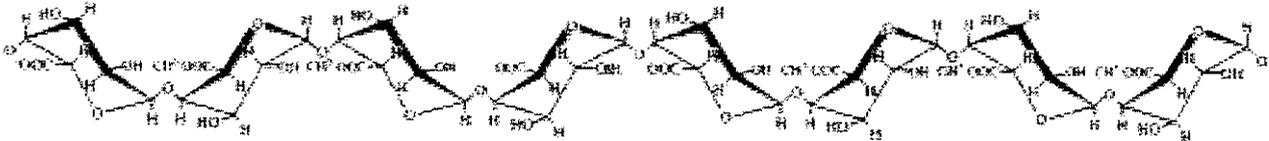
### **1.5. Substâncias pécticas**

Substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais, que ocorrem nas paredes celulares e lamela média dos vegetais superiores. São responsáveis pela integridade e consistência dos tecidos dos vegetais. Embora elas ocorram em frutas e legumes em quantidades que não excedem a 1% p/p, são de grande importância para sua consistência e homogeneidade (ROMBOUTS e PILNIK, 1978). Essas substâncias consistem de uma cadeia principal composta por unidades de ácido D-galacturônico com ligações  $\alpha$ -1,4, com seus grupos carboxílicos parcialmente esterificados com grupos metoxílicos, conforme apresentado na Figura 1.5.

Segundo WHITAKER (1990), substâncias pécticas são a designação global para os derivados coloidais de carboidratos que ocorrem em plantas, ou são preparados a partir destas contendo uma grande proporção de unidades de ácido galacturônico anidro. Os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico podem estar parcialmente esterificados por grupos metila, 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.

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. As substâncias pécticas, dependendo do grau de esterificação 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 (FOGARTY e WARD, 1974).



**Figura 1.5.** Estrutura da molécula de pectina parcialmente esterificada  
Fonte: (Serra *et al.*, 1992).

### 1.5.1. Enzimas pectinolíticas:

Segundo MACMILLAN e SHEIMAN (1974), o termo “enzimas pectinolíticas” ou pectinases, normalmente designa as enzimas capazes de degradar os poliuronídeos das moléculas das substâncias pécticas. Estas enzimas são produzidas por plantas e microrganismos. 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 despolimerase e subdivididas conforme a especificidade quanto ao substrato preferencial (pectina, ácido péctico ou oligogalacturonato) e segundo o padrão de ação (endo-enzimas e exo-enzimas). Podem ser classificadas em polimetilgalacturonase (**PMG**), poligalacturonase (**PG**), polimetilgalacturonato liase (**PMGL**) e poligalacturonato liase (**PGL**) (WHITAKER, 1990; ALKORTA *et al.*, 1998). O anexo A mostra o esquema da ação das frações pectinolíticas sobre a cadeia de pectina.

**1.5.1.1. Pectinaesterase (PMGE):** Esta fração 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 péctico, dependendo da extensão da hidrólise e produção de metanol (Figura 1.5.1.1) (WHITAKER, 1990).

**1.5.1.2. Polimetilgalacturonase (PMG):** Esta fração pectinolítica presumivelmente hidrolisa polimetilgalacturonatos a oligometilgalacturonatos, embora alguns pesquisadores questionam a existência desta enzima. FOGARTY e WARD (1974) reportaram a existência de duas frações endo-PMG em um preparado enzimático de *A. niger*. A primeira fração apresenta pH ótimo igual a 4,0 e hidrolisa pectina altamente esterificada, produzindo desde ácidos pentagalacturônicos até ácidos galacturônicos; a segunda fração, com pH ótimo 7,0, hidrolisa também pectina altamente esterificada, produzindo desde ácidos pentagalacturônicos até ácidos digalacturônicos.

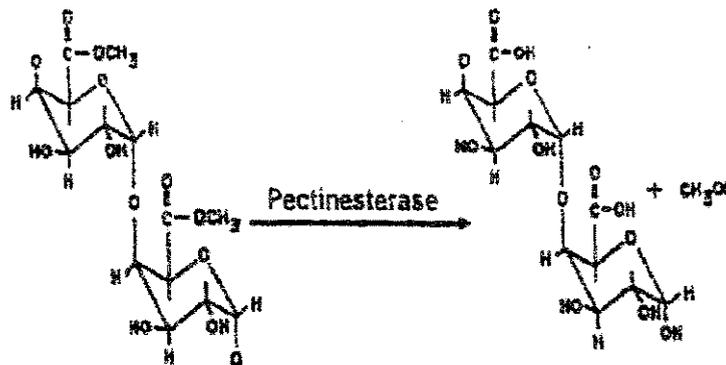


FIGURA 1.5.1.1. Mecanismo de ação da enzima pectinesterase.

(Fonte: MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

**1.5.1.3. Poligalacturonase (PG):** A fração endo-PG 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 (Figura 1.5.1.3). Esta fração pode ser obtida a partir de várias plantas e microrganismos, ocorrendo freqüentemente em múltiplas formas moleculares. A fração exo-PG ocorre em plantas, fungos, bactérias e insetos; o produto final da hidrólise é o ácido galacturônico. 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).

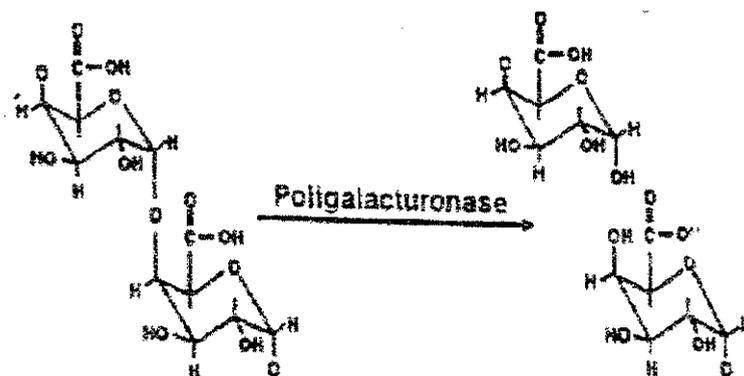


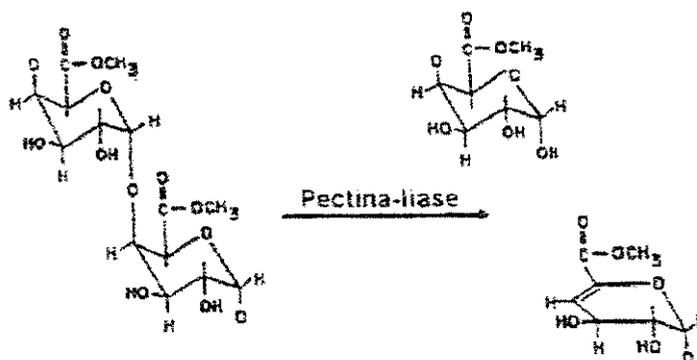
FIGURA 1.5.1.3. Mecanismo de ação da enzima poligalacturonase.

(Fonte: MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

**1.5.1.4. Polimetilgalacturonato liase (PMGL):** A endo-PMGL 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. A fração da endo-PMGL é produzida quase que exclusivamente por fungos, tendo sido demonstrado sua ocorrência em apenas duas linhagens de *Erwinia* e uma de *Pseudomonas*. A exo-PMGL ainda não foi descrita em nenhum estudo (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; WHITAKER, 1990).

**1.5.1.5. Poligalacturonato liase (PGL):** A fração endo-PGL é produzida somente por microrganismos, basicamente por bactérias e alguns fungos. Ela atua sobre o poligalacturonato, produzindo oligogalacturonatos insaturados, sendo os pectatos geralmente bons substratos para esta enzima (Figura 1.5.1.5). A atividade de endo-PGL diminui à medida que o comprimento da cadeia de oligogalacturonato diminui. 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. A degradação de poligalacturonatos e oligogalacturonatos a 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).



**FIGURA 1.5.1.5.** Mecanismo de ação da enzima pectinase.

(Fonte: MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

### 1.5.2. Produção de Enzimas Pectinolíticas

A produção industrial de pectinases é feita basicamente por fungos, particularmente do gênero *Aspergillus*, embora inúmeros trabalhos científicos apontem outros gêneros e espécies com potencialidade aplicadas para este fim.

A seleção do microrganismo capaz de produzir a enzima em níveis adequados é o primeiro passo para a produção comercial de qualquer enzima microbiana. Esta seleção é feita com espécies e linhagens capazes de produzir a enzima desejada e a linhagem selecionada poderá sofrer melhoramentos genéticos, para atingir níveis de produção mais elevados. Os parâmetros que afetam a síntese da enzima microbiana devem ser estudados para otimizar a sua produção. Entre os fatores mais importantes que influenciam a produção da enzima pode-se citar a espécie (ou linhagem) microbiana, a composição do meio, o pH e a temperatura (FOGARTY e WARD, 1974; FOGARTY e KELLY, 1979).

ALAHÑA et al. (1989) estudaram a produção de PMGL por dezesseis microrganismos em meio submerso, e verificaram que o fungo *P. italicum* CECT 2294 apresentou maior atividade específica desta fração frente aos demais. Este fungo não apresentou atividade de PMGE, mas apresentou atividade de PG. Os autores verificaram que o pH final da cultura desenvolvida por 6 dias foi sempre inferior a 4,0 e ressaltaram que pectinases capazes de atuar nesta condição de acidez são interessantes às indústrias de processamento de frutas. A atividade de PMGL em relação ao crescimento microbiano (biomassa) foi independente do tamanho do inóculo e teve seu máximo no segundo dia de fermentação. Adição de glicose (3% peso/volume) ao meio demonstrou ser mais eficaz que a adição de sacarose, sendo também mais eficaz frente ao meio contendo somente pectina, na produção de atividade de PMGL. Observaram também que a presença de glicerolfosfato demonstrou ser importante para a extensão da produção de PMGL e este não inibiu a produção da enzima, enquanto que a presença de glicerol, na mesma concentração, diminuiu 50% a produção da mesma.

As atividades de PMGL e de outras frações enzimáticas em SmF e FSS de *P. italicum* CECT 2294, foram estudadas por ALAHÑA et al. (1990). Neste estudo foi observado que o fungo produziu atividade de PMGL extracelular, induzida por pectinas com alto grau de esterificação, em baixos valores de pH e apresentou baixas atividades de PG e PGL em FSS e nenhuma atividade em FSm. A atividade de PMGL obtida das FSm e FSS foi maior sobre pectina com maior grau de esterificação. Na FSm, o pH ótimo para a produção de PMGL esteve entre 6,0 e 7,0 sendo que a enzima teve maior atividade entre pH 3,0 e 7,0 quando comparando a faixa de pH de 7,0 a 9,0.

Segundo WHITAKER (1990) a existência da fração PMG é questionada, uma vez que nenhum autor foi capaz de demonstrar a presença desta enzima, quando poligalacturonato 100% metilado foi usado como substrato na ausência de PMGE e endo-PGL. Segundo ele, a maioria dos relatos na literatura não são conclusivos em relação à caracterização das diversas frações pectinolíticas,

principalmente as referentes à fração PMG. A existência desta fração também foi questionada por MACMILLAN e SHEIMAN (1974), que basearam-se no fato de que o mecanismo de quebra da cadeia por trans-eliminação fora descoberto somente em 1960, o que tornaria óbvio que estudos descrevendo PMG anteriormente a esta data, na realidade descreviam, pelo menos na sua maior parte, a fração PMGL.

A produção de exo-pectinase constitutiva de *Aspergillus sp* CH-Y-1043 em SmF com diferentes fontes de carbono como glicose, frutose, sacarose, glicerol, ácido galacturônico, pectina cítrica e ácido poligalacturônico foi estudada por AGUILAR e HUITRON (1990). Esses autores concluíram que no meio contendo glicose como substrato ocorreu atividade de enzimas constitutivas. Nos meios com sacarose, frutose, glicerol, ácido galacturônico ou glicose, enriquecidos com extrato de levedura, ocorreu o máximo do crescimento celular, iguais aos meios somente com glicose, sacarose, frutose ou glicerol. No meio com ácido galacturônico, o crescimento do fungo foi 56% maior comparado com os outros meios.

BARACAT et al. (1991) estudaram a utilização de polpa de laranja em FSm como fonte de carbono, para a produção de PG por *A. fumigatus*. Os resultados observados são melhores comparativamente aos obtidos tanto com pectina quanto com celulose, amido, lactose, sacarose e glicose. O microrganismo provavelmente apresentou outras frações dentro do seu sistema pectinolítico, uma vez que a atividade de pectinase total (TP) foi superior a atividade da fração PG.

SAID et al. (1991) estudaram a produção de pectinases por *P. frequentans* em FSm. Concluíram que a melhor temperatura para a produção de pectinase ficou entre 30 e 35°C. Neste estudo, foram observadas atividades de pectinaesterase, em pH 2,5 e pH 7,0, e de pectina liase, em pH 8,0. Das fontes de carbono testadas, a pectina, o ácido poligalacturônico e casca de citrus induziram a produção de pectinases, enquanto que a adição de arabinose, celobiose,

celulose, frutose, galactose, glucose, maltose, manitol, manose, sacarose, trealose e xilose não levaram a indução da produção dessa enzima.

Foi estudada também, a produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Observou-se que tanto a fração exo-PMG como a fração exo-PG, ambas purificadas, apresentaram temperatura ótima de 45°C. A atividade da enzima exo-PG apresentou uma diminuição da atividade quando mantida a 65°C por 10 minutos, sendo completamente inativada após incubação a 60°C por 4h. A fração exo-PMG exibiu 40% de sua atividade máxima após a incubação à temperatura de 45°C por 4h e 50% de atividade após 60°C por 4h, sendo completamente inativada quando submetida a temperatura de 80°C por 4h. O pH ótimo para a exo-PMG foi 5,0, enquanto que para a fração exo-PG, foi 4,0. A caracterização da ação de exo-pectinases foi feita pela verificação de que o único produto obtido no início da reação apresentava baixo peso molecular (RIOU et al., 1992).

ANTIER et al. (1993) estudaram a produção de pectinases em FSS, utilizando polpa de café como substrato. O objetivo desses autores foi o de produzir pectinase usando linhagens mutantes de *A. niger* CH4 (*A. niger* C28B25, *A. niger* C16C25, *A. niger* C17B25) e *Penicillium sp* C15B25. O mutante *A. niger* C28B25 foi o maior produtor de pectinases, com cerca de 135 U/g DP (peso seco).

MIKHAILOLOVA et al. (1994) estudaram a biossíntese de PL de *P. adametzii*, *P. citrinum* e *P. janthinellum* em FSm. Concluíram que os substratos com pectina de maçã e beterraba e ácido D-galacturônico, foram excelentes indutores de pectinases para os três fungos utilizados. O fungo *P. janthinellum* produziu 80% da biomassa total nas primeiras 48 horas de fermentação e a síntese enzimática teve início após 72 horas, quando também foi detectada a atividade de exo-PL e uma quantidade pequena de endo-PL. Com o fungo *P. adametzii*, obtiveram o crescimento e a síntese de endo-PL nas primeiras 48 horas de fermentação e após este período, a produção de exo-PL. Com o fungo *P.*

*citrinum*, a síntese enzimática e a presença de pectinaliases foram observadas após 24 horas de fermentação e, após 72 horas, foi detectada atividade de endo-PL, sendo que sua atividade máxima ocorreu com 96 horas de fermentação. Também foi estudada a repressão da síntese enzimática com meio contendo 0,2% de pectinas de maçã ou de glicose, além da combinação de ambas. Também foi testada a adição de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). O cAMP afetou a biossíntese enzimática quando o meio continha glicose, pois quando esta foi utilizada; observou-se inibição da síntese enzimática, sendo detectadas apenas enzimas constitutivas. O meio contendo pectina demonstrou ser um ótimo substrato na ausência de glicose.

ISMAIL (1996) utilizou bagaço de laranja como fonte de carbono para a produção de um complexo multienzimático contendo pectinases, celulases e xilanases através de FSm. Os fungos *A. oryzae* 1911 e o fungo *P. chrysogenum* 3486 foram testados. O autor concluiu que o fungo *A. oryzae* 1911 foi o mais efetivo, com alta produção de multienzimas após 5 dias de incubação.

GALIOTOU-PANAYOTOU et al. (1997) estudaram as condições de crescimento de *Aspergillus sp.* ATHUM-3482 em FSm, utilizando como fonte de carbono bagaço de laranja e açúcar de beterraba. As atividades máximas de PG e endo-PG, em meio com bagaço de laranja, foram obtidas após 5 dias de fermentação. A máxima atividade de PG e endo-PG no meio com açúcar de beterraba, foi obtida após 6 dias de fermentação, atingindo valores maiores comparativamente ao obtido com o bagaço de laranja.

BEROVIC e OSTROVERSNIK (1997) estudaram a produção de enzimas pectinolíticas em fermentação semi-sólida de *Aspergillus niger* usando polpa de maçã, farinha de soja e farelo de trigo, como substratos, em reator horizontal. Obtiveram atividade máxima de 15 mgKg<sup>-1</sup> de poligalacturonase e 200 mgKg<sup>-1</sup> de pectinaesterase.

Foram estudados os efeitos de fontes de carbono, assim como, diferentes concentrações de substrato sobre a produção de pectinase por *A. japonicus* 586 em FSm. O meio de cultura foi inoculado com  $5 \times 10^6$  esporos/ml e mantido sob agitação (140 rpm), a 30°C durante 122 horas. A melhor atividade enzimática encontrada foi no meio com 0,5% de pectina (pectinaesterase), 0,2% de pectina com 0,2% de glicerol (endo-PG) e 0,5% de pectina associada a 0,5% de glicose (exo-PG). As concentrações de fonte de carbono, isoladas ou associadas, afetaram significativamente a atividade enzimática das três enzimas. A pectina, glicose e sacarose, quando adicionadas no meio de cultura em altas concentrações, exibiram um efeito de repressão na síntese das enzimas em questão (TEIXEIRA et al., 2000).

CASTILHO et al. (2000) estudaram a produção de pectinases em FSS de resíduo agroindustrial, usando *A. niger*. A cinética da síntese enzimática foi estudada por período de 13 a 96 horas, com umidade variando de 25% a 70% (p/p). A umidade do meio de 40% e o tempo de fermentação de 22 horas foram selecionados e nestas condições resultaram em altas atividades de poligalacturonase.

Foram estudadas a produção, purificação parcial e a caracterização de poligalacturonase de *Bacillus* sp. MG-cp-2 em meio semi-sólido utilizando farelo de trigo e fibra de rami como substrato e foram obtidos 3200 U/g e 590 U/g de poligalacturonase, respectivamente. A enzima foi 100% estável em temperatura de 50°C por 12 horas e 80% em pH alcalino (7,0 –12,0) por 24 horas (KAPOOR et al., 2000).

GÓMEZ et al. (2001) estudaram a produção de poligalacturonase obtida de *Kluyveromyces marxianus* em fermentação submersa usando como substrato caldo de cana-de-açúcar. Para definirem as melhores concentrações dos nutrientes a serem utilizados no meio fermentativo utilizaram planejamentos

fatoriais fracionados da Metodologia de Análise de Superfície de Resposta. Os resultados indicaram que o caldo de cana-de-açúcar pode ser utilizado nas concentrações entre 9,17° e 14,83 °Brix, suplementado com sulfato de amônio e pectina em concentrações entre 0,40 e 0,58 g/ 100 mL e 0,50 e 1,05 g/ 100 mL, respectivamente.

SILVA et al. (2002) estudaram a produção de pectinase e poligalacturonase por *P. viridicatum*, utilizando como substrato bagaço de laranja, farelo de trigo, tegumento de milho e casca de banana e manga em FSS. Obtiveram máxima atividade de 30U.g<sup>-1</sup> quando utilizaram farelo de trigo como fonte de carbono, e 2000 U.g<sup>-1</sup> com bagaço de laranja com outros substratos, os outros valores obtidos foram inferiores.

Alguns autores estudaram a influência da variação da concentração de inóculo de *A. niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção da enzima poligalacturonase em FSS, onde utilizaram farelo de trigo triturado acrescido de 5% de amido como substrato empregando biorreator com colunas de vidro de 210 mm de altura e 22 mm de diâmetro. Observaram que a relação de 0,06 L e a concentração de conídios de 107/g de meio foram as condições mais favoráveis para síntese de PG (máxima produção de 33,08 U/mL com 64 horas de fermentação) (TERZI et al., 2003).

Foi estudada por PANAROTTO et al. (2003), a produção de endo e exo-PG por *A. niger* T0005007 em FSS utilizando diferentes espessuras de meio (0,5 a 8 cm), formulado com farelo de trigo (37% p/p), pectina cítrica purificada (6% p/p) como indutor de atividade enzimática e solução de nutrientes. Observaram que os picos de atividade foram alcançados com 72 horas de processo para os meios com maior espessura (até 6 cm), com um pequeno decréscimo nas amostras de meios com 8 cm de altura.

MARTIN et al. (2003) estudaram o melhor tempo de cultivo para a produção das enzimas exo e endo-PG, pectinase e pectinaesterase, assim como, a produção de enzimas hemi-celulolíticas e amilolíticas pelos fungos *Moniella* sp 9SB e *Penicillium* sp EGC% em FSS. O fungo *Penicillium* sp EGC5 apresentou apenas um pico para a produção de exo, endo-PG e PL enquanto que o fungo *Moniella* sp 9SB mostrou dois picos para a produção de exo-PG, um para a endo-PG e três para a PL.

### **1.5.3. Aplicação de Enzimas Pectinolíticas**

Substâncias pecticas são derivados coloidais de carboidratos que ocorrem em plantas, e que contêm 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 (KERTESZ, 1951).

Estas substâncias 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. A principal função biológica destas substâncias é de caráter estrutural. São responsáveis pela união das células uma às outras, além de serem componentes da parede celular primária, juntamente com a celulose e a hemicelulose (HENNIES, 1996).

Protopectina é o termo usado para descrever substâncias pecticas insolúveis em água que ocorrem em plantas (KILARA, 1982). A insolubilidade deste composto em água deve-se provalmente ao tamanho do polímero, ou à ligação com cátions divalentes (especialmente  $Ca^{+2}$ ) e/ou outros polissacarídeos como celulose e hemicelulose (WHITAKER, 1990).

Os ácidos poligalacturônicos coloidais contendo uma quantidade significativa de grupos metil éster, são denominados de ácidos pectínicos. Os ácidos pectínicos são capazes de formar géis com açúcar e ácido, e se o teor de metoxila for baixo, a formação de gel poderá ocorrer com certos sais de cálcio (KASHYAP, et al. 2001)

Ácido péctico é o termo aplicado às substâncias pécticas compostas, em sua maior parte, por ácidos poligalacturônicos coloidais completamente livres de grupos metil éster. Os sais dos ácidos pécticos são pectatos neutros ou ácidos (KASHYAP et al., 2001).

Pectina é o nome genérico da mistura de diferentes compostos contendo ácido pectínico como o maior componente. Na sua forma natural é localizada na parede celular e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais ou proteínas na forma insolúvel (KASHYAP, 2001).

Durante o processo de maturação das frutas, as substâncias pécticas existentes nas mesmas, sofrem hidrólise parcial formando um composto parcialmente solúvel (pectina), resultando no amolecimento da estrutura dos tecidos. Estes tecidos vegetais, quando prensados para extração do suco, contêm pectina em sua composição que será carregada junto com o suco devido seu grau de solubilidade, onde resulta em um aumento da viscosidade e dificuldade na extração e otimização nos rendimentos da produção do suco.

FARIA et al., (1994) estudaram as transformações enzimáticas das substâncias pécticas da manga (*Mangífera indica* L.) v. haden no amadurecimento. Analisaram amostras da fruta correspondentes aos estágios verde maduro e armazenadas por 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias a temperatura em torno de 20°C. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese de uma possível ação conjunta dessas enzimas na transformação das substâncias pécticas da manga, cuja ação inicial da pectinaesterase parece preparar a protopectina, pela

remoção dos grupos metila, para a ação posterior da poligalacturonase, que atuaria inicialmente na quebra das ligações internas das cadeias de pectina (atividade de endo-PG) e a seguir nas ligações dos ácidos galacturônicos terminais (atividade de exo-PG).

As enzimas pectinolíticas são largamente empregadas nas indústrias de alimentos. Nas indústrias que processam frutas são muito utilizadas na extração aumentando a quantidade de suco livre, pois a adição de enzimas antes da prensagem facilita a liberação do suco e resulta em rendimentos e capacidade de prensagens consideravelmente melhores. A despectinização completa através de um complexo adequado de pectinase, assegura uma adequada clarificação e filtração dos sucos, assim como uma boa estabilidade para os sucos concentrados produzidos. Atuam na quebra da emulsão de óleo essencial que se forma após a extração do suco, aumentam a remoção de pigmentos e ácidos orgânicos e inibem a geleificação do suco concentrado. Na produção de vinhos são muito utilizadas, pois diminuem a viscosidade, o tempo de processamento em vários estágios e o gasto de energia para aquecimento, prensagem e centrifugação; diminuem também a temperatura de processo evitando alterações indesejadas na cor e no sabor devido a caramelização e, em geral, atuam na estabilização e clarificação de sucos de frutas e na eliminação de substâncias pécnicas de vegetais (PLATT e POSTON, 1972; ROMBOUTS e PILNIK, 1978; SCHWIMER, 1981; GERHARTZ, 1990).

SOARES et al. (2001) estudaram a aplicação de pectinases de *Bacillus* sp na extração de sucos e concluíram que as enzimas utilizadas proporcionaram altas extrações nos sucos de frutas e vegetais e boas características na prensagem das polpas.

Em indústria têxtil, a adição de pectinases pode ser usada no tratamento de fibras brutas vegetais, no qual causam a degradação da pectina resultando na

separação das fibras de celulose da parede celular. A degomagem das fibras requer, portanto, pectinases livres de celulases (BARACAT-PEREIRA et al., 1993).

No preparo de alimentos infantis, as enzimas pectinases podem ser usadas na maceração enzimática de vegetais durante a produção de néctar e polpa de fruta ou de vegetais (PEPPLER e REED, 1987).

Na extração de óleos vegetais (canola, palmeira, oliva etc.), elas degradam os componentes presentes na polpa facilitando a extração. Também são usadas na fermentação de chá e café; na fermentação de café elas atuam na camada externa do grão removendo-a; na fermentação de chás são usadas para acelerar o tempo de fermentação (KASHYAP et al., 2001).

Devem ser destacadas também, as desvantagens do uso das enzimas pectinases. Na fabricação de vinhos brancos, sua utilização pode alterar a cor, uma vez que o ácido galacturônico liberado pode favorecer o escurecimento não enzimático (Reação de Maillard), causando assim uma coloração escura indesejável em vinhos brancos (SCHWIMMER, 1981).

Nos preparados enzimáticos comerciais pode ocorrer o acúmulo de metanol devido à ação da fração pectinaesterase. A concentração de metanol pode ser alta comparada com o limite permitido para sucos de frutas e vinhos, podendo atingir níveis substanciais quando a pectinase é empregada no tratamento dos bagaços de maçã e de uva. Nos sucos de frutas cítricas e de tomate pode ocorrer clarificação espontânea devido a presença de enzimas pectinolíticas na fruta, o que não ocorre nos sucos de maçã e uva nos quais as pectinases estão presentes em baixas concentrações, sendo necessária adição de enzimas comerciais durante o processo industrial (PEPPLER e REED, 1987).

## **CAPÍTULO II**

**FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE BAGAÇO DE LARANJA  
INDUSTRIALIZADO EM EMBALAGENS DE POLIPROPILENO  
PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Penicillium*  
*Italicum* IZ 1584**

## 1. INTRODUÇÃO

A fermentação semi-sólida (FSS) tem sido alvo de estudos por pesquisadores do mundo todo, devido a sua importância quanto a produção de produtos de alto valor comercial, utilizando como substratos resíduos sólidos e subprodutos de baixo custo. Esses resíduos e subprodutos incluem os celulósicos, que encontram-se facilmente disponíveis para serem utilizados diretamente como via fermentativa como polpa de café, bagaços, palhas e cascas de frutas processadas e os amiláceos, como os resíduos de processamento de milho e mandioca.

Alguns autores definem a fermentação semi-sólida como aquela onde o substrato sólido utilizado contém água livre em baixa quantidade; portanto, não está suspenso em água e não apresenta escoamento aquoso (PANDEY et al. 2000; GUTIERREZ-ROJAS et al. 1997).

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais utilizados em FSS pois a maioria não são patógenos, adaptam-se melhor que as bactérias em meios com baixa disponibilidade de água, esporulam facilmente e são ótimos produtores de substâncias de alto valor comercial como antibióticos, vitaminas, enzimas e outros produtos. Entre os microrganismos utilizados para a produção de enzimas pode-se citar: *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Flavobacterium sp*, *Candida utilis*, *Aspergillus orizae*, *Aspergillus foetidus*, etc (WHITAKER, 1990).

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos mais diversos processos industriais, em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima passa a ter valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo industrial (BRAVO et al. 2000). As enzimas produzidas em FSS que merecem destaque devido a grande aplicação e alto valor comercial são principalmente as amilases, xilanases, proteases e pectinases.

As enzimas pectinolíticas são largamente empregadas na indústria de alimentos, principalmente na clarificação de sucos de frutas e eliminação de substâncias pécticas de alimentos vegetais, extração de óleos, maceração de linho e tratamento de fibras brutas em indústrias têxteis e na fermentação de café, cacau e fumo nas indústrias de fermentados (PANAROTTO et al., 2003).

## **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudar a produção de pectinases em embalagens de polipropileno por *Penicillium italicum* IZ 1584, utilizando como substrato bagaço de laranja industrializado;
2. Definir o melhor método para a extração do extrato enzimático bruto em relação ao tempo de agitação e solvente utilizado;
3. Estudar a produção de outras enzimas durante o processo fermentativo, pelo fungo em questão.

### **3. MATERIAL e MÉTODOS**

#### **3.1. Substrato para cultivo do fungo**

O substrato utilizado para a fermentação foi o subproduto sólido de indústrias de suco cítrico (bagaço de laranja), constituído basicamente de membranas, sementes e polpa, e obtido junto à indústria cítrica CITROVITA - Agroindustrial Ltda - Catanduva S.P. Esse material, sem óleo essencial, foi gerado a partir do processamento de laranjas das variedades Natal e Valência, colhidas no mês de dezembro de 1999 e processadas no mesmo mês, de acordo com os esquemas dos anexos B e C.

#### **3.2. Preparo do substrato**

##### **3.2.1. Moagem do bagaço de laranja**

A moagem do bagaço de laranja foi feita em moinho de martelo, Máquina Dumore, modelo 7104, 0-60 Hz, 9000 rpm e 5/8 Hp.

#### **3.3. Caracterização do substrato**

##### **3.3.1. Granulometria**

A análise granulométrica do bagaço de laranja triturado foi realizada em agitador de peneiras magnético, marca Bertel, máquina número 319, série 8703, com escala variável de agitação (0 a 10). Foram realizadas 3 repetições, utilizando-se 4 peneiras marca Granutest : ABTN 12 ( Tyler 10), ABTN 16 (Tyler 14), ABTN 25 (Tyler 24) e ABTN 70 (Tyler 65). A posição da escala de agitação empregada foi a máxima (10) por 30 minutos.

### **3.3.2. Umidade**

A umidade do bagaço de laranja foi determinada a partir da medida da diferença de massa entre as amostras úmidas e as amostras secas. A secagem foi realizada sob temperatura de 105°C em estufa, com as amostras acondicionadas em frascos previamente tarados. Após 24 horas de secagem, os frascos foram colocados em dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida, pesados em balança analítica.

### **3.3.3. Determinação do pH do bagaço de laranja e das amostras dos meios fermentados**

Foi preparada uma suspensão do bagaço de laranja em água destilada na proporção de 1:10 (massa:volume). Após agitação a 150 rpm por 15 minutos em mesa rotativa, fez-se a determinação do pH da suspensão em potenciômetro da marca ANALION PM 608.

### **3.4. Determinação de açúcares redutores (método de Somogyi - Nelson)**

#### **3.4.1. Preparo dos reagentes**

Este método emprega duas soluções distintas. A primeira, denominada de Reagente de Somogyi-Nelson I foi preparada pela dissolução de 4,0 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), 24,0 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  anidro, 16,0 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 12,0 g de tartarato de sódio e potássio e 18,0 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nesta ordem, em 600 mL de água destilada. O volume foi completado para 1,0 litro em balão volumétrico e a solução foi deixada em repouso por uma noite em ambiente escuro. Após este período, a solução foi filtrada através de papel de filtro Whatman número 4 e o reagente estocado em frasco escuro. A segunda solução, denominada de Reagente de Somogyi-Nelson II, foi preparada a partir de duas outras soluções. A

primeira foi preparada 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  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  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, o reagente foi estocado em frasco escuro.

### 3.4.2. Dosagem dos açúcares

O procedimento para a determinação de açúcares redutores totais foi feito pela adição de 2,0 mL de Reagente de Somogyi-Nelson I a um tubo contendo 1,0 mL de amostra (item 3.10). Após agitação manual, a mistura obtida foi incubada em banho em ebulição por 6 minutos e os tubos, ao final deste período, foram resfriados em banho de gelo. Foram adicionados 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 absorvância a 540 nm foi lida em espectrofotômetro e 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 absorvância

### 3.5. Microrganismo

Os microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, obtido junto ao Instituto Zimotécnico, ESALQ/USP, Piracicaba, S.P. A manutenção da cultura foi feita através de repiques em tubos de ensaio contendo meio ágar-batata-dextrose (BDA) inclinado, os quais foram incubados a 28°C. Depois de cinco dias, o crescimento foi coberto com óleo mineral estéril e a cultura mantida a 7°C.

### **3.6. Inóculo**

O inóculo para a FSS foi preparado pela adição de solução de tween 80 0,01% aos tubos de ensaio contendo a cultura pura do fungo *P. italicum* IZ desenvolvida por 7 dias, a 28°C, em meio BDA. As suspensões de esporos foram obtidas após raspagem do ágar com alça de inoculação, seguida de agitação manual.

### **3.7. Contagem de esporos e inoculação**

A contagem de esporos em cada suspensão foi feita utilizando-se câmara de Neubauer. Foi utilizado um volume de 3 mL de suspensão de esporos para cada 30 g de substrato sólido, o que equivale a  $10^7$  esporos/g de substrato.

### **3.8. Meios de cultura**

Os meios de cultivo para a FSS foram definidos a partir do meio utilizado por HENNIES (1996) e RIZZATTO et al. (1999). Nos meios de fermentação foram utilizados bagaço de laranja como substrato, enriquecidos com soluções de nutrientes minerais:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### **3.9. FSS em embalagens de polipropileno**

Trinta gramas (30 g) de bagaço de laranja foram acondicionados em embalagens de polipropileno de dimensões 20,0 cm x 30,2 cm e em seguida, foram adicionados os sais em solução aquosa. A umidade final do substrato foi ajustada com água destilada e fixada em 75%. A embalagem contendo o meio de cultivo foi selada, homogeneizada manualmente e esterilizada em autoclave a 121° C por 15 minutos. Após resfriamento, o meio foi inoculado com suspensão de esporos ( $6,25 \times 10^7$  de *P. italicum* IZ 1584) previamente preparados conforme item 3.7, e em seguida, o material inoculado foi incubado a 28°C.

### **3.10. Extração da enzima a partir do material fermentado**

Depois de fermentado, o material foi homogeneizado e retiradas amostras de cada embalagem, para a extração de enzimas. Para 5 g de amostra foram adicionados 100 mL de água destilada e logo após, o sobrenadante foi filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman número 1. O filtrado foi usado para determinações de pH, atividades enzimáticas e açúcares redutores totais (ART).

### **3.11. Estudo do tempo da extração enzimática**

Uma alíquota do extrato enzimático bruto foi misturada a 0,5 mL de solução de pectina cítrica a 1% em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 e incubada em banho-maria a temperatura constante de 40°C por 10, 15, 20, 30 e 60 minutos. Após cada período, foram determinados os grupos redutores liberados, pelo método de Somogyi-Nelson.

### **3.12. Determinação das atividades enzimáticas**

#### **3.12.1. Exo – poligalacturonase**

A atividade enzimática de exo-PG foi determinada pela quantificação dos grupos redutores liberados na reação enzimática. Uma alíquota de solução enzimática bruta (0,5 mL) foi misturada a 0,5 mL de solução de pectina cítrica 0,1% em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 e incubada em banho-maria à temperatura constante de 40°C durante 20 minutos. 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 pela solução enzimática bruta previamente inativada em banho-maria em ebulição por 10 minutos.

A quantificação dos grupos redutores, expressos como ácido galacturônico, foi realizada pelo método de SOMOGYI (1952). A atividade de pectinase foi calculada pela diferença entre as concentrações dos grupos redutores presentes nas amostras e nos respectivos controles. Uma unidade internacional da atividade (UI) foi definida como  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico produzido por ml de enzima por minuto. Para a fermentação em meio semi-sólido a atividade enzimática foi também expressa em UI por grama de material fermentado úmido (UI/ gMFU).

### **3.12.2 Endo – poligalacturonase**

A atividade de Endo-PG foi determinada utilizando-se o viscosímetro Visco Basic (Fungilab) numa mistura de reação composta por 5,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 6,0 com pectina a 3%, 0,7 mL de tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 6,0 e 2 mL da solução enzimática. O controle constou da mesma mistura, porém com a enzima inativada. A medida foi realizada em centipoise, e através da mesma, foi calculada a porcentagem de redução da viscosidade da amostra em relação ao controle. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% da viscosidade do substrato em dez minutos e foi calculada através da seguinte fórmula:

$$U = (\% \text{ redução obtida} / 50 / \text{volume de enzima})$$

### **3.12.3. Atividade de pectinaliase (PL)**

A mistura de reação para determinar atividade de PL foi composta de 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5, contendo 1% de pectina (64 - 72% de esterificação) e 0,5 mL de solução enzimática. A incubação ocorreu a 45°C por 30 min. e a interrupção da reação, por adição de 10 mL de HCl a 0,2 M. A quantificação dos produtos (uronídeos insaturados) foi feita pela leitura da absorbância a 235 mn segundo o método de ALBERSHEIM (1966). Uma Unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove liberação de  $1\mu\text{mol}$

de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 5550.

### **3.12.3. Determinação da Atividade de Pectinaesterase (PE)**

A atividade da PE foi determinada pela quantificação do metanol liberado no meio, de acordo com WOOD e SIDDIQUI (1971). Em 2 mL de solução de pectina 0,1% (p/v) foram adicionadas 4 mL de tampão acetato pH 7,5 com 0,001 M de  $\text{CaCl}_2$  e 2 mL de preparado enzimático. A mistura foi incubada a 25 °C por 40 minutos. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de metanol por minuto, a 40°C.

### **3.12.4 Determinação da atividade de xilanase**

A atividade xilanase foi medida através da mistura de reação composta por 0,2 mL do extrato bruto enzimático e 1,8 mL de uma solução 0,5% de xilana (Birchwood-Sigma) em tampão acetato 0,1 M e pH 6,0. Após a incubação, feita em temperatura de 50°C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ADNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de xilose por minuto nas condições de ensaio.

### **3.12.5 Determinação da atividade de CMCase**

A atividade CMCase foi determinada pelo mesmo procedimento descrito para xilanase, exceto que o substrato utilizado foi carboximetilcelulose (CMC-Sigma-5678) e a substância redutora foi quantificada a partir de curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições de ensaio.

### **3.12.6 Determinação da atividade de amilase**

A atividade amilase foi medida através da mistura de reação que constou de 0,8 mL de tampão citrato-fosfato a 0,1 M e pH 6,0 a 0,3% de amido, com 0,2 mL de enzima a qual incubada por 10 minutos, a 55°C. O açúcar redutor liberado após a incubação foi quantificado pelo método do ADNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

### **3.12.7 Determinação da atividade de proteases**

A atividade protease foi medida através da mistura de reação que constou de 2 mL de solução de caseína 2% em 1 mL do extrato enzimático que foram incubados a 37°C por 30 minutos. O controle foi feito com 1 mL do extrato enzimático, 2 mL de caseína 2% e 2 mL de solução de TCA 10%, incubados 37°C por 5 minutos. O branco foi feito com 1 mL do extrato enzimático em solução de TCA e 2 mL de solução de caseína 2%. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma diferença de absorbância de 1,0, por 30 minutos, a 37°C e por ml de solução enzimática.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização do substrato usado na FSS

A composição química, umidade e pH do bagaço de laranja usado são apresentados na Tabela 4.1.1.

**Tabela 4.1.1. Composição química do bagaço de laranja (\*)**

<b>Compostos</b>	<b>Valores (%)</b>
Fibras	11,76
Proteínas	6,4
Nitrogênio	6,3
Minerais (Ca, Mg, Fe, Mn, Co, Cu, Zn, P, K e Na)	6,7
Pectina	0,1
pH	4,5
AR (%)	9,0
ART(%)	19,4
Umidade(%)	9,0

Os dados médios do perfil granulométrico do bagaço de laranja, para três repetições, conforme especificado no item 3.3.1, são apresentados na Tabela 4.1.2. Os resultados mostram que cerca de 88,84% do material representam granulometria igual ou superior a 0,21 mm (peneira).

(\*) Dados fornecidos pelo Departamento de Controle de Qualidade - CITROVITA-Agroindustrial Ltda-Catanduva S.P.

TABELA 4.1.2.: Granulometria do bagaço de laranja.

Peneira (ABTN)	Abertura (mm)	Massa de Bagaço Retido (g) Bagaço não lavado
12	1,68	14,8
16	1,19	15,47
25	0,71	23,3
70	0,21	35,3
Fundo	-	11,13
Total	-	100,00

#### 4.2. Estudo do tempo da reação enzimática

Para a determinação da atividade de pectinase houve necessidade de se adequar o tempo de reação, como descrito no item 3.12. Observa-se pela Figura 4.2 que a concentração de substâncias redutoras, a absorção a 230 nm e a redução da viscosidade da solução de pectina aumentam significativamente até 15 e 20 minutos de reação e, após este intervalo, permanecem praticamente

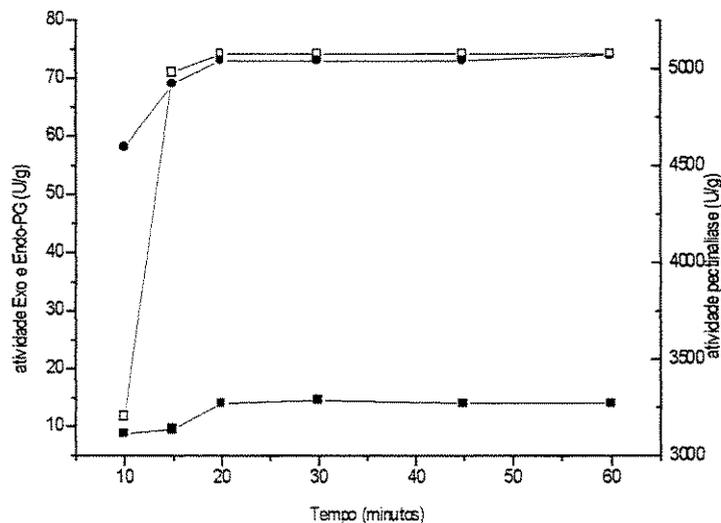


Figura 4.2. Hidrólise de pectina por pectinases de *P. italicum* IZ 1584 (- - - - exo-PG, - ● - endo-PG e - □ - pectinálise)

constantes, indicando que a reação cessou por inibição das enzimas pelo produto final ou pela exaustão do substrato na mistura reacional. Desta forma, adotou-se o tempo de 15 minutos de reação em todas as análises subsequentes para determinação de atividade enzimática de exo-PG e PL e 20 minutos para atividade de endo-PG.

## 5. Estudo da extração das enzimas

A extração das enzimas em estudo foi realizada de acordo com o item 3.10. A Tabela 5.1 mostra que o tempo de agitação influenciou na extração das enzimas, havendo aumento até uma hora de agitação resultando em 70 U/g de endo-PG, 14,7 U/g de exo-PG e 8700 U/g de pectinaliase. GHILDYAL et al. (1991) verificaram que com a agitação ocorreu maior extração enzimática de amiloglicosidase de *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida de farelo de trigo e SILVA (2003) observou 30 minutos de agitação como melhor tempo de extração de pectinases. Dados antagônicos aos descritos neste experimento foram obtidos por SING et al. (1999). Segundo esses autores, o tempo de extração enzimática maior que 15 minutos aumentou a viscosidade e a coloração de extrato, diminuindo a atividade enzimática.

**Tabela 5.1.** Extração de enzima em relação ao tempo de agitação usando água destilada como solvente

Tempo (minutos)	Exo-PG (U/g)	Endo-PG (U/g)	Pectinaliase (U/g)
1	10	28	1000
15	12	34	5100
30	13	38	6600
45	13	43.8	7100
60	14.7	70	8700

A tabela 5.2 mostra as atividades de exo, endo-PG e pectinase realizadas obtidas após 30 minutos de extração, usando diferentes solventes. Pode-se observar que dos solventes usados para extração, o tampão tris-HCl pH 8,0 foi o que permitiu maior extração das enzimas: 64,3 U/g para endo-PG, 15 U/g para exo-PG e 3420 U/g para pectinase. Comparando com a água destilada pode-se observar valores maiores para o tampão tris-HCl (60% para endo-PG, 87% para exo-PG e 76% para pectinase).

**Tabela 5.2.** Atividades enzimáticas em relação aos solventes, após 30 minutos de extração

<b>Solvente</b>	<b>Exo-PG (U/g)</b>	<b>Endo-PG (U/g)</b>	<b>Pectinase (U/g)</b>
<b>NaCl 2%</b>	12,2	28,0	3560
<b>Tampão tris-HCl pH 8,0</b>	15,0	64,3	8700
<b>Tampão acetato/fosfato pH 4,0</b>	11,0	32,0	3420
<b>Água destilada</b>	10,0	38,0	6600

O tampão acetato-fosfato pH 4,0 permitiu obter cerca de 70% para endo-PG, 90% para exo-PG e 80% para pectinase, comparadas com o solvente com o qual obteve-se maior valor de extração. A solução de NaCl 2% foi o que permitiu menores valores de atividade enzimática: 44% de endo-PG, 80% de exo-PG e 41% de pectinase.

SILVA (2003) estudou a extração de pectinases produzidas por *Penicillium viridicatum* RFC3 em bagaço de laranja e farelo de trigo com diferentes solventes e concluiu que o melhor solvente foi o tampão acetato fosfato comparado com a água destilada e tampão Tris-HCl.

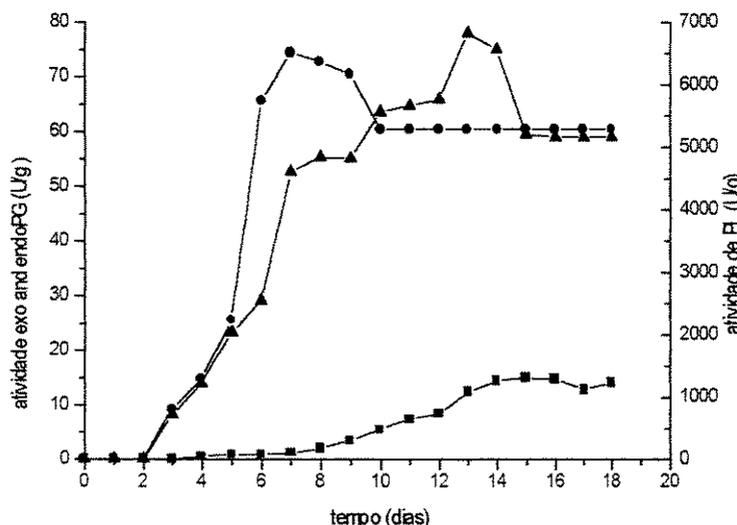
Na extração das enzimas, o solvente ideal deve ser capaz de retirar o produto seletivamente, preferivelmente à temperatura ambiente e com o menor tempo de contato. Existem alguns fatores que afetam sua eficiência, como a

natureza e características de solubilidade do produto, difusividade do solvente no sólido e presenças de compostos interferentes no substrato sólido (KRIEGER, 2001).

## 6. Estudo da produção das enzimas pectinolíticas em embalagens de polipropileno.

Neste estudo foram analisadas as atividade de exo e endo-PG, pectinaliase e pectinaesterase, teor de ART e pH dos meios de fermentação em embalagens de polipropileno com o fungo *Penicillium italicum*, utilizando bagaço de laranja como substrato (Figuras 6.1, 6.2 e 6.3).

Pela Figura 6.1 observam-se as atividades enzimáticas de exo-PG, endo-PG e pectinaliase ao longo do processo fermentativo de 18 dias. A produção máxima de endo-PG e exo-PG foi obtida após o sétimo dia e décimo quinto dias, respectivamente. Para pectinaliase, a produção máxima ocorreu no décimo quarto

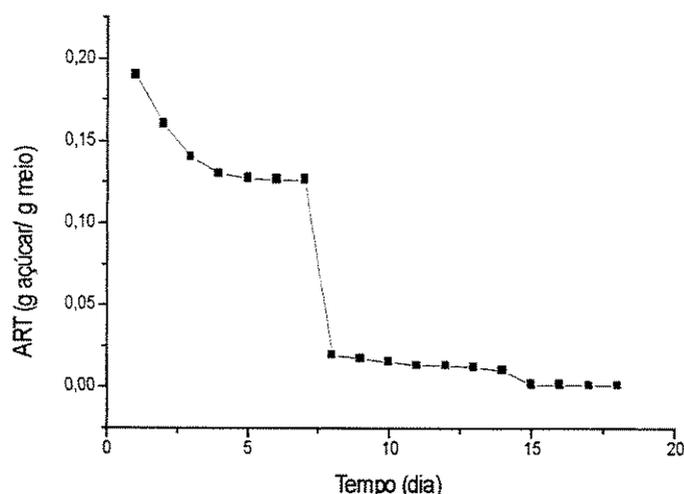


**Figura 6.1.** Atividades de pectinases obtidas fermentação de bagaço de laranja por *P. italicum*, em embalagens de polipropileno, ( - ■ - exo-PG; - ● - endo-PG; - ▲ - pectinaliase)

dia de fermentação. Este período de fermentação foi longo quando comparado com ISMAIL (1996) e GARZÓN e HOURS (1992) que usaram também bagaço de laranja como fonte de carbono para produção de pectinases e hemicelulases por *A. niger*, 48 e 36 horas, respectivamente.

A fermentação de bagaço de laranja por *P. italicum* resultou em quantidades altas de pectinase e níveis significantes de endo-PG (máxima atividade de 6820 U/g e 74,4 U/g, respectivamente) comparados com dados da literatura. Para exo-PG foram obtidos valores de atividade de 15U/g. Em estudos de produção de poligalacturonase por espécies de *A. niger* em fermentação semi-sólida, usando farelo de trigo e soja, bagaço de cana de açúcar e polpa de café, foram obtidos 12,6 U/g, 15 U/g e 47,7 U/g de atividade dessa enzima, respectivamente (CASTILHO et al., 1999; SOLIS-PEREIRA et al., 1993; BOCCAS, et al., 1994). A produção de pectinase usando bagaço de maçã, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos foi de 1062 U/g, 70 U/g e 2,14 U/g, respectivamente (HOURS, et al., 1988; ACUNA-ARGUELES, et al., 1995; TARAGANO, et al., 1999).

A Figura 6.2 mostra a variação da concentração de açúcares redutores totais do meio de fermentação. Pode-se observar que o substrato apresentou uma

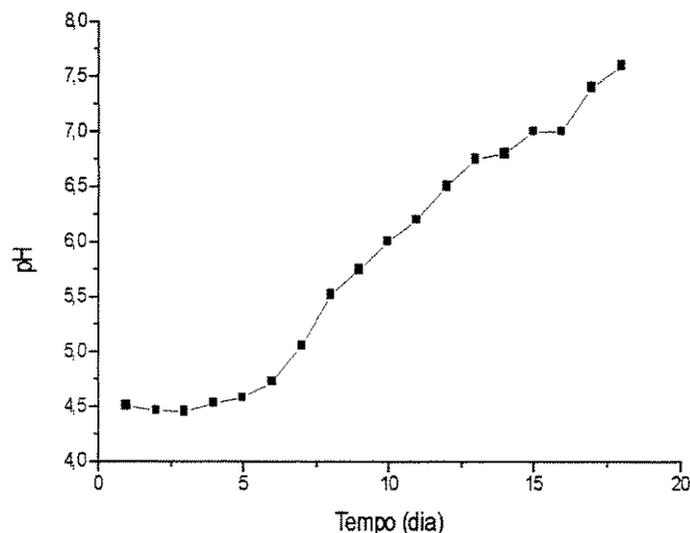


**Figura 6.2.** Açúcares redutores totais da fermentação de bagaço de laranja por *P. italicum* em embalagens de polipropileno.

grande quantidade de açúcares a qual foi metabolizada ao longo da fermentação. O mesmo foi observado por SILVA (2003) quando utilizou farelo de trigo e bagaço de laranja para a produção de pectinases. Os açúcares redutores e totais foram assimilados em até 96,28% e 91,08% quando utilizou embalagens de polipropileno e Erlenmeyers, respectivamente, como recipientes para fermentação.

Até o sétimo dia de fermentação a redução de açúcares redutores foi lenta, entretanto após esse dia seguiu-se uma acentuada redução nos teores dos mesmos, coincidindo com o aumento da atividade enzimática da exo e endo-PG e pectinaliase. O consumo de açúcar assimilável do meio fermentativo promove melhor crescimento fúngico e conseqüentemente melhor colonização do meio ao mesmo tempo, que retira do meio, possíveis açúcares repressores da síntese das enzimas (SATO e SUDO, 1999).

A Figura 6.3 nos mostra o comportamento do pH do meio durante a fermentação. Pode-se observar que o pH aumentou durante todo o processo de fermentação sendo atingido um valor máximo de pH de 7,6. Este aumento, pode ser explicado pela degradação de ácidos orgânicos ou proteínas existentes no



**Figura 6.3.** pH da fermentação de bagaço de laranja por *P. italicum* em embalagens de polipropileno

meio de fermentação (por proteases) com a conseqüente liberação de aminoácidos (ou peptídeos) alcalinos. Essa hipótese pode ser reforçada pela determinação da atividade de protease que foi feita durante a fermentação de acordo com o item 3.11.3.

HECK et al. (2002) observaram aumento de pH durante o processo de fermentação, quando estudaram a produção de celulase e xilanase por linhagens de *Bacillus* em FSS, onde utilizaram, como substrato, resíduo de soja industrializado. Estes autores concluíram, que a variação do pH do meio pode ter ocorrido através da lise celular do microrganismo utilizado, causando a liberação de aminoácidos básicos e peptídeos no meio fermentativo.

A atividade da enzima pectinaesterase foi acompanhada ao longo do processo de fermentação em embalagens de polipropileno. Não foi observado atividade pectinolítica desta enzima. Logo conclui-se que o fungo *P. italicum* não é um produtor desta enzima nas condições e meio de fermentação utilizados neste trabalho.

## **7. Produção de outras enzimas despolimerizantes**

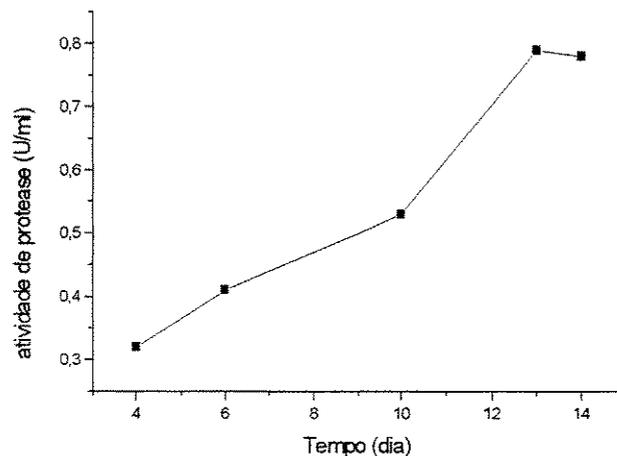
Foi traçado o perfil enzimático de produção de protease, CMCase, amilase e xilanase durante o processo fermentação nos itens 3.11.4., 3.11.5., 3.11.6. e 3.11.7 (Tabela 7.1).

Das enzimas analisadas, só foi detectada atividade de proteases (Figura 7.1), o que pode vir a confirmar o aumento do pH e o decréscimo da atividade observado durante todo processo fermentativo (Figuras 6.1 e 6.3). HECK et al. (2002) observaram redução da atividade de celulasas e xilanases na presença de proteases no meio fermentativo.

**Tabela 7.1.** Atividades enzimáticas da fermentação em embalagens de polipropileno de bagaço de laranja de *P. italicum*.

Tempo (dia)	Protease	CMCase	Amilase	xilanase
4	0,32	ND	ND	ND
6	0,41	ND	ND	ND
10	0,53	ND	ND	ND
12	0,79	ND	ND	ND
14	0,78	ND	ND	ND

ND = não detectado



**FIGURA 7.1.** Atividade de protease em embalagens de polipropileno de bagaço de laranja por *P. italicum*.

Por um lado, a produção de proteases pelo fungo reduziu a atividade de pectinase, mas por outro, teve-se a produção de mais uma enzima também de grande interesse comercial. O valor da atividade de protease encontrado neste trabalho (0,8U/mL), é considerado baixo, comparado com outros trabalhos da literatura. MITIDIERI et al. (2002) e MARQUARDT et al. (2002) encontraram valores de atividades enzimáticas de 188 U/mL e  $7,5 \times 10^3$  U/mL de *Bacillus* em FSm, respectivamente. SOARES et al. (2003) em FSS utilizando torta de babaçu e de soja como substrato, encontraram valores de 960 U/g de atividade de proteases de *Bacillus subtilis*. SILVA et al. (2003) encontraram 8,7 U/mg de

atividade, de *Penicillium aurantiogriseum* em FSS, utilizando farinha de soja como substrato.

A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas têm levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. As proteases microbianas contam aproximadamente por 40% da venda total mundial de enzimas e são preferidas às de plantas e animais. Elas são aplicadas na indústria de detergentes e de alimentos (RAO et al., 1998; BEYNOM e BOND, 1989).

## 8. CONCLUSÕES

- No estudo da atividade enzimática em embalagens de polipropileno de *P. italicum* IZ 1584, foi observada atividades máximas de exo-PG (15 U/g) após o décimo quinto dia de fermentação, de endo-PG (74,4 U/g) após o sétimo dia e pectinálise (6820 U/g) após o décimo quarto dia;
- No estudo da extração da enzima, o solvente tampão tris-HCl pH 8,0 foi o que proporcionou maior extração frente a água destilada, tampão acetato-fosfato pH 4,0 e NaCl 2%;
- O tempo de 60 minutos de agitação foi o mais eficiente no processo de extração da enzima;
- O fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 não foi capaz de produzir outras enzimas como xilanase, CMCase, amilase e pectinaesterase ao longo do processo fermentativo com bagaço de laranja como substrato; porém, produziu pequenas quantidades de proteases.

## **CAPÍTULO III**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES EM REATOR DE  
COLUNA COM DIFERENTES UMIDADES, AERAÇÕES E  
DENSIDADES APARENTES**

## 1. INTRODUÇÃO

A fermentação semi-sólida é uma técnica antiga muito utilizada na produção de alimentos orientais como shoyu, tempeh e missô, e alimentos típicos de países ocidentais como iogurte, queijo e pão. Ao longo dos anos, pesquisadores têm utilizado substratos orgânicos e inertes em fermentação semi-sólida em escala laboratorial ou piloto para obtenção de vários produtos. Geralmente os substratos utilizados são resíduos ou subprodutos de baixo custo como: bagaço de laranja e cana, palha de arroz e milho, farelo de trigo e polpa de beterraba, entre outros (BELLON-MAUREL et al., 2003).

Vários autores mostram que o processo de fermentação semi-sólida comparado com a fermentação submersa possui vantagens no bioprocessamento e na produção de vários produtos. Ficou estabelecido que em alguns casos como das enzimas e compostos bioativos, a produção foi maior no processo de FSS comparado com o processo FS<sub>m</sub>. Assim, o desenvolvimento da aplicação de FSS vem sendo utilizada em várias áreas como a de biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos tóxicos agro-industrial e desenvolvimento de produtos biologicamente ativos como metabólitos secundários, incluindo antibióticos e outras drogas, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, etc. (PANDEY et al., 2000).

Em FSS a escolha do fermentador é muito importante, pois antes da escolha é preciso definir os objetivos da mesma, como a análise econômica dos custos iniciais e operacionais do processo, a possibilidade de monitoramento e controle de diversos parâmetros, etc. Vários tipos de biorreatores têm sido utilizados em processos de FSS, incluindo tambores rotativos, bandejas, reatores horizontais e verticais, entre outros (MITCHELL et al., 2000). Os tubulares verticais são os mais utilizados quando se quer estudar parâmetros, pois são os que mais se adaptam ao aumento de escala ("scale up") e ao controle de

processos (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1992).

O controle de determinados parâmetros se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. O controle da umidade e da aeração do meio são muito importantes durante o processo fermentativo. A umidade está envolvida no desenvolvimento da biomassa e reações metabólicas, atividade enzimática e nutrientes, transporte de gás e metabólitos extra-celular. A umidade considerada ótima varia entre 30 a 85% dependendo do substrato utilizado. A variação da umidade no processo fermentativo ocorre com a evaporação da água devido ao calor metabólico gerado ao longo do processo fermentativo, com a hidrólise do substrato e produção de água metabólica. A aeração é importante, pois o microrganismo aeróbio necessita de oxigênio para se desenvolver e a fermentação ocorrer de forma contínua. A quantidade de ar estéril a ser introduzida no processo fermentativo vai depender da natureza do microrganismo utilizado, da quantidade de calor metabólico a ser dissipado do processo, da espessura da camada do substrato, da quantidade de gás carbônico e outros metabólitos voláteis eliminados. Geralmente a aeração ocorre com ar umidificado estéril para que não ocorra o ressecamento do meio fermentativo dificultando o crescimento do microrganismo (LONSANE et al., 1985; BELLON-MAUREL et al., 2003).

## **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar a produção de pectinases em reator de coluna com umidades diferentes no meio de cultivo;
- Estudar a produção de pectinases com diferentes aerações na coluna de fermentação;
- Estudar a influência da densidade aparente no meio de cultivo.

### 3. MATERIAL e MÉTODOS

#### 3.1. Substrato para cultivo do fungo, caracterização e preparo

O substrato utilizado, seu preparo e caracterização está descrito no item 3 do capítulo II.

#### 3.2. Microrganismo

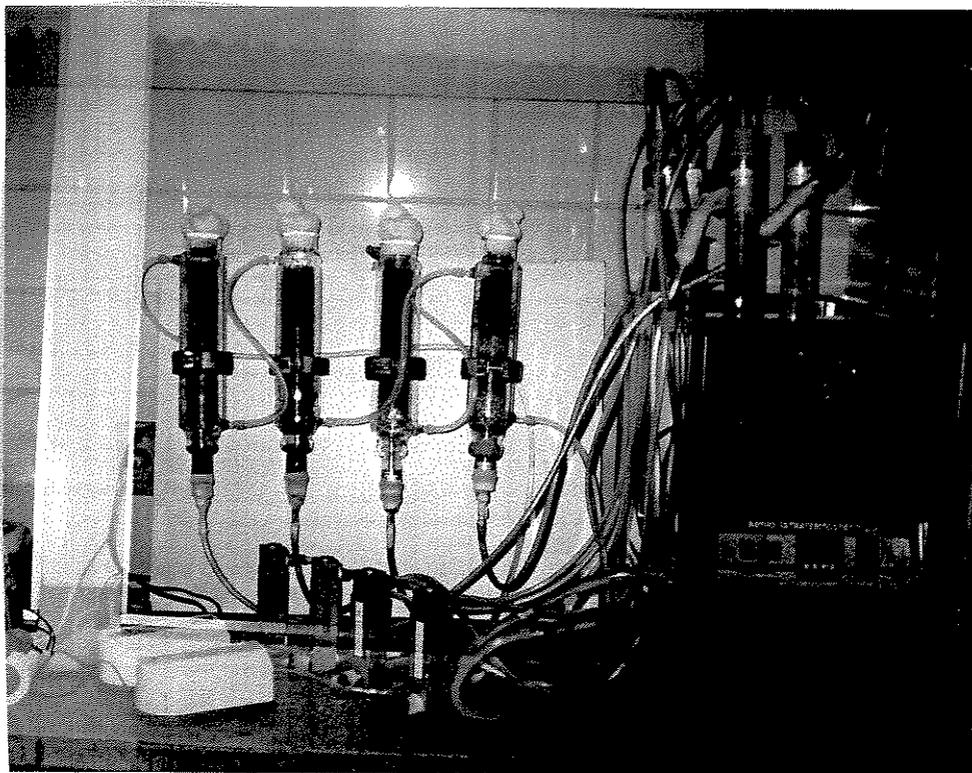
O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 como descrito no item 3.5 do capítulo II.

#### 3.3. FSS em reator de coluna

Foram usados fermentadores de coluna com leito fixo, construídos de vidro pirex de 50 mm de diâmetro e 300 mm de altura de leito. Em cada fermentador foi colocado bagaço de laranja triturado adicionado de sais e inoculado com esporos do fungo. Os constituintes do meio foram pesados e preparados como descrito no item 3.9 (capítulo II). A autoclavagem foi realizada a 121°C por 30 minutos. Após resfriamento, os meios foram inoculados com a suspensão de esporos ( $10^7$  esporos/g) previamente preparada, homogeneizados e transferidos assepticamente para os fermentadores. A massa seca do meio semi-sólido utilizada foi de 100 g por biorreator. A umidade em cada biorreator foi de 50%, 55%, 60% e 65%, respectivamente.

O ar injetado na base da coluna foi saturado com vapor de água estéril e este passou por um rotâmetro para controle de sua vazão (5 a 35 L/h), através de um distribuidor construído de Teflon e aço inoxidável, de maneira a minimizar a formação de caminhos preferenciais. A temperatura foi mantida constante a 28°C pela circulação de água através da camisa do reator. A montagem experimental do reator é apresentada nas Figuras 3.3.1 e 3.3.2.

As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas, em função da fase em que se encontrava o processo fermentativo.



**FIGURA 3.3.1.** Montagem experimental dos reatores de coluna em funcionamento.

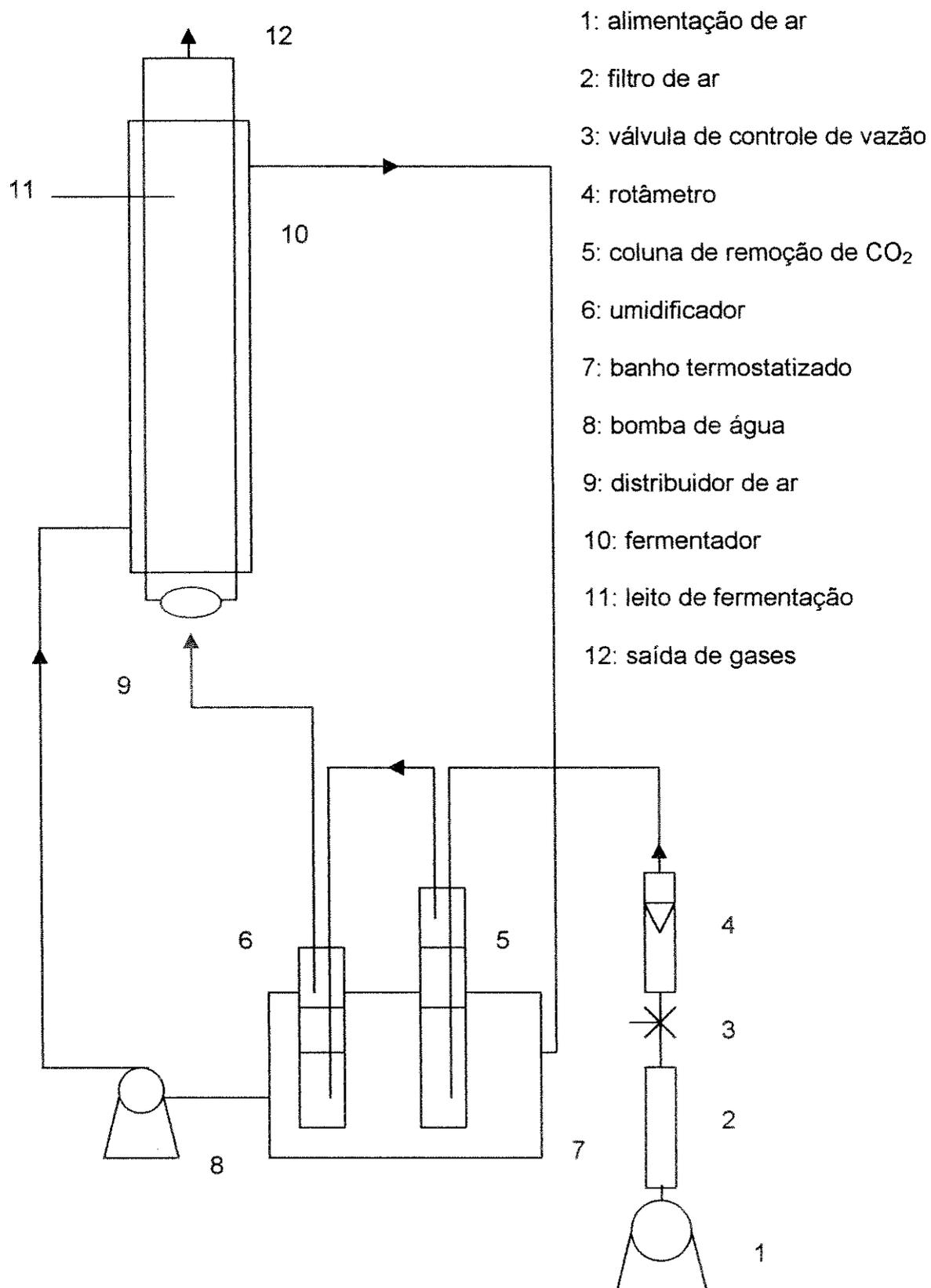


FIGURA 3.3.2. Esquema experimental proposto para o fermentador de coluna com leito fixo.

### **3.4. Determinação da densidade aparente ( $d_{ap}$ )**

Foram utilizadas várias massas das amostras (substrato) com diferentes umidades (50%, 55% e 60%) para determinação das densidades aparentes. Conhecendo-se a massa das amostras e o volume do reator, consegue-se a densidade aparente fazendo-se a razão da massa e volume ocupado.

$$d_{ap} = \frac{M}{V_u} \quad (3.1)$$

onde,

$M$  = massa inicial do meio (g)

$V_u$  = volume do reator ocupado pela massa de meio (L)

Para realizar a compactação dos meios e obter várias densidades diferentes, foi utilizado um vibrador e uma massa de volume conhecido que era solto sempre da mesma altura. Foram realizados 5 ensaios para cada valor de densidade para diminuir os erros nas medidas.

### **3.5. Determinação das atividades enzimáticas**

As atividades de pectinases foram avaliadas conforme descrito no item 3.11 do capítulo II.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo da produção das enzimas pectinolíticas em reator de coluna com diferentes umidades do meio

Neste estudo foram analisadas as atividade de exo e endo-PG, pectinaliase, teor de ART e pH dos meios de fermentação em reator de coluna com o fungo *Penicillium italicum* utilizando bagaço de laranja como substrato como mostram as Figuras 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3, com umidade de 50, 55, 60 e 65% de umidade, como descrito no item 3.3.

A Figura 4.1.1 mostra a atividade da enzima exo-PG de fermentação semi-sólida em reator de coluna, com meios com diferentes umidades. Observa-se que os meios com 50, 55 e 60% de umidade tiveram atividade máxima de exo-PG de 119,2 U/g no décimo quarto dia de fermentação, 150,4 U/g no décimo primeiro dia e 154,4 U/g no sexto dia, respectivamente. Pode-se observar que, com o aumento da umidade, o valor máximo de atividade enzimática ocorreu mais cedo durante o processo de fermentação. Visualmente, pode-se notar o crescimento mais rápido do fungo nos meios com maiores umidades, pois logo no terceiro dia a coluna encontrava-se totalmente tomada por esporos (Figura 4.1.1.1).

Os meios com umidade 55% e 60% apresentaram máxima atividade de exo-PG com valores bem próximos, mostrando que a variação de umidade não influenciou na atividade enzimática e sim no tempo de fermentação que ocorreu mais rápido no meio com 60%, bem como no crescimento do fungo.

O meio com umidade de 65% não pode ser estudado, pois a umidade foi considerada alta para este tipo de substrato e reator. Pôde-se observar um escorrimento da água pela coluna havendo acúmulo na parte de baixo, causando um descontrole da umidade, durante o processo fermentativo.

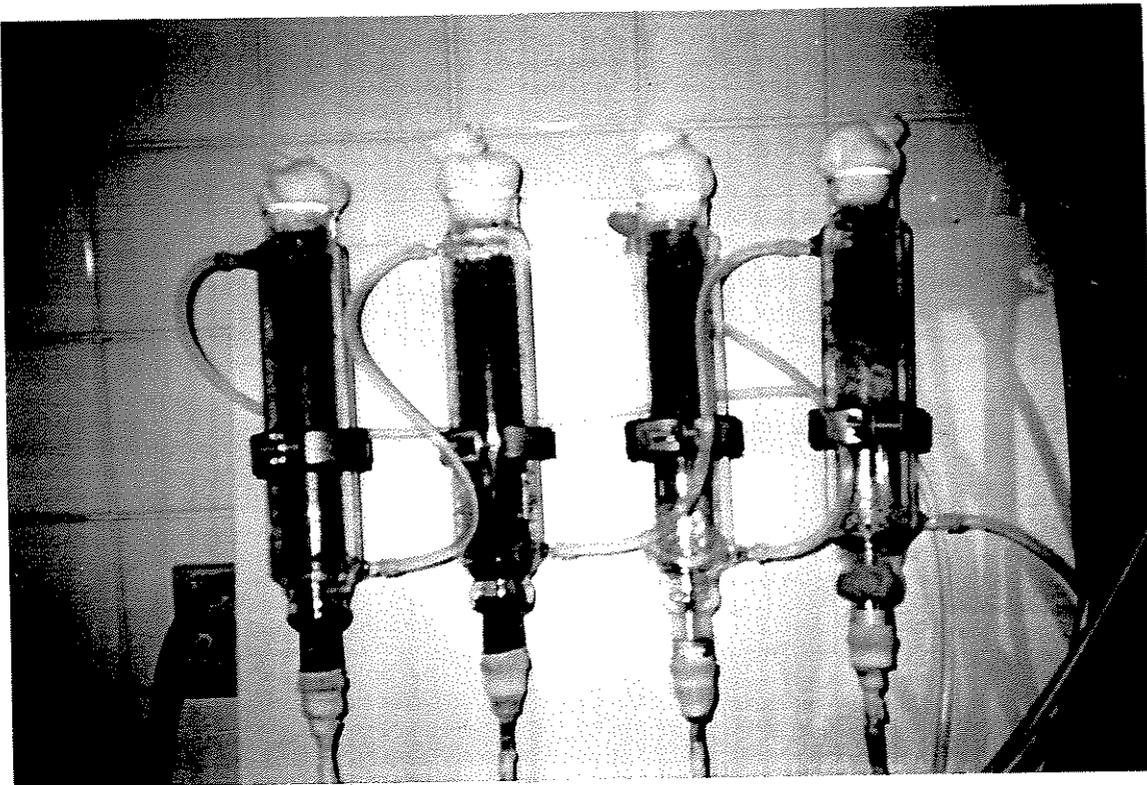


FIGURA 4.1.1.1. Colunas de fermentação com bagaço de laranja de *P. italicum* com umidade de 50% e 55%.

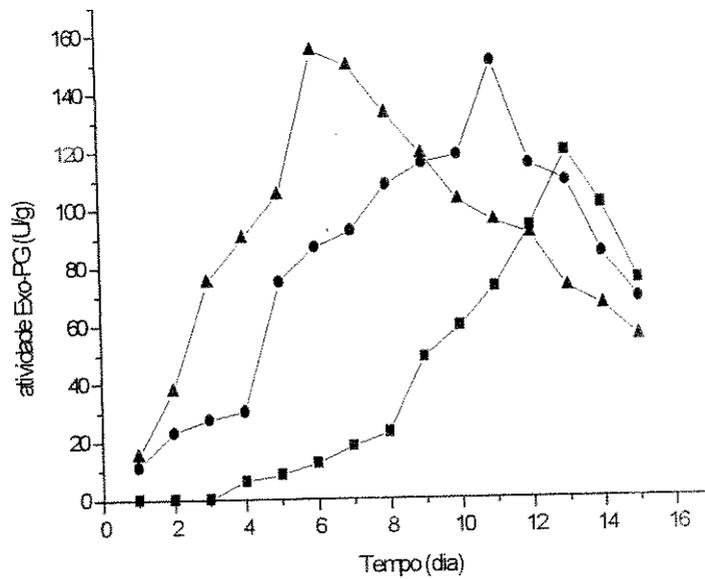
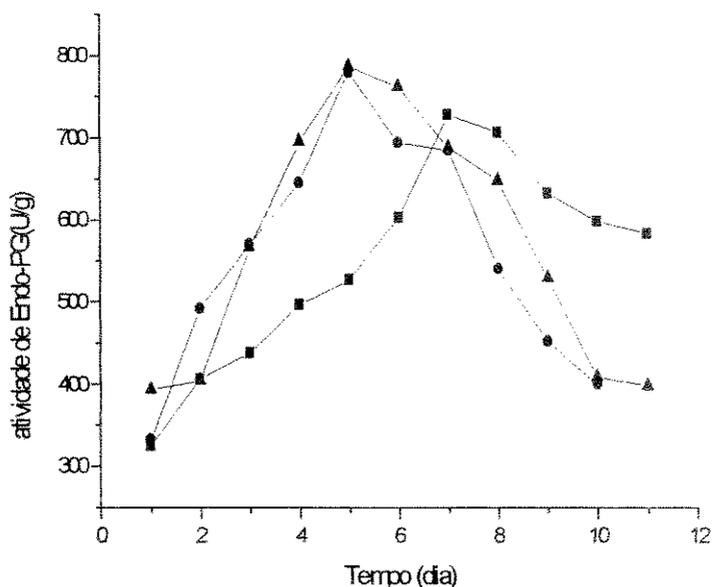


Figura 4.1.1. Atividade de Exo-PG *P. italicum* em meios com diferentes umidades (- ■ - 50%; - ● - 55%; - ▲ - 60%)

A Figura 4.1.2 mostra a atividade de endo-PG. Pode-se observar que no meio com 50% de umidade houve pequena produção de enzimas comparado com os meios de 55% e 60% de umidade mostrando que a umidade de 50% foi insuficiente para o crescimento do fungo e conseqüentemente para a produção de enzima. Observa-se valor máximo de atividade de endo-PG de 728 U/g no sétimo dia de fermentação para o meio com 50% de umidade e 780 U/g e 787 U/g no quinto dia de fermentação para os meios com 55% e 60% de umidade, respectivamente.

Pode-se concluir que os meios com maiores teores de umidade apresentaram valores máximos de atividade próximos, o que leva a concluir que a diferença de umidade não interferiu na atividade enzimática de endo-PG. Assim, o conteúdo de umidade de 50% a 60% dos meios foram suficientes para umedecer o substrato, disponibilizar água para o fungo e ajudar na difusão de oxigênio favorecendo a produção das enzimas.

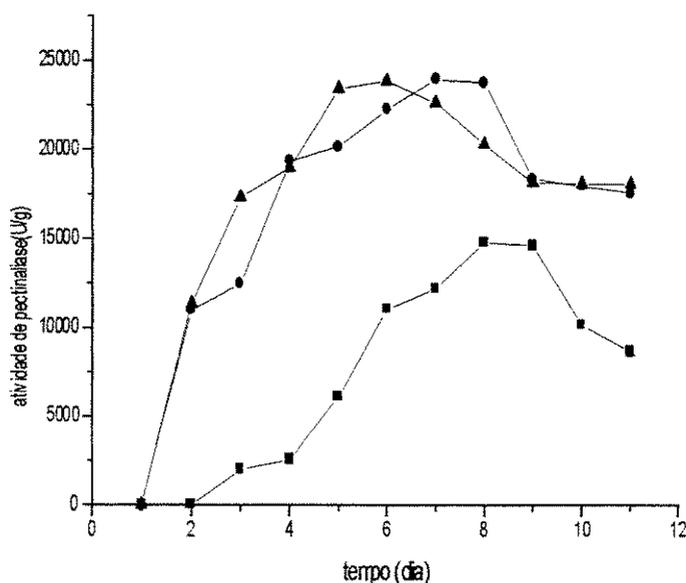


**Figura 4.1.2.** Atividade de Endo-PG de *P. italicum* em meios com diferentes umidades( - ■ - 50%; - ● - 55%; - ▲ - 60%)

A Figura 4.1.3 mostra a atividade de pectinaliase nos meios de fermentações com diferentes umidade. Observa-se que as atividades máximas de pectinaliase para os meios de fermentações foram de 14764 U/g e 23927 U/g para os meios com 55% e 60% de umidade, respectivamente, e ocorreram no oitavo dia de fermentação. O meio com 60% de umidade teve sua atividade ótima de 23818 U/g no sexto dia de fermentação. Os valores de atividade de pectinaliase dos meios com 55% e 60% de umidade ocorreram em dias diferentes, mas com valores próximos.

CASTILHO et al. (2000) estudaram a produção de pectinases de *A. niger* em resíduos agroindustriais em FSS variando a umidade do substrato de 25% a 75% (p/p). Os meios contendo 40% e 55% de umidade foram os que obtiveram maiores valores de poligalacturonases.

Os meios com umidade maior que 60% e menor que 55% levaram a conseqüências negativas no crescimento do microrganismo e na difusão de oxigênio do meio onde foram reduzidas diminuindo a atividade enzimática. Segundo ACUNÃ-ARGUELLES et al. (1994) o meio com baixa umidade modifica a



**Figura 4.1.3.** Atividade de pectinaliase em meios com diferentes umidades (-■- 50%; -●- 55%; -▲- 60%)

membrana celular do fungo, causando limitações no transporte de transferência de calor e massa afetando o metabolismo microbiano.

Portanto, pelos dados analisados pode-se concluir que as umidades de 55% e 60% mostraram-se mais adequadas para a produção de pectinaliase pelo sistema utilizado.

#### **4.2. Estudo da produção das enzimas pectinolíticas em reator de coluna com diferentes aerações**

Nesta etapa do trabalho foram estudadas a produção das pectinases em reator de coluna sob diferentes intensidades de taxas de aerações. Na primeira coluna, a fermentação foi realizada sem nenhuma aeração e a partir da segunda foram utilizadas vazões de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 L/h, sucessivamente. Os meios de fermentação foram preparados como descrito no item 3.9 (capítulo II) e a umidade do meio adotada foi 55%.

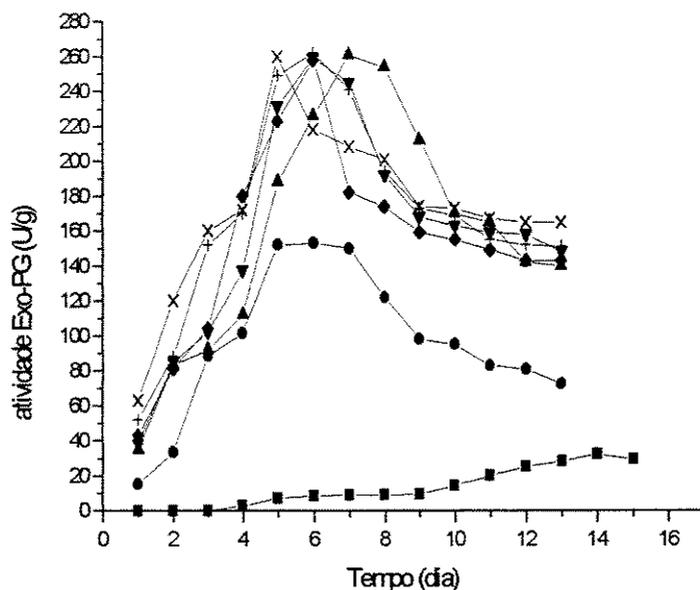
As Figuras 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 mostram as atividades de exo e endo-PG e pectinaliase durante os ensaios de fermentação em reatores de coluna. Pode-se observar, que o meio para produção das enzimas sem aeração não produziram atividade enzimática de exo-PG e pectinaliase nos três primeiros dias de fermentação e produziram máximo valor de atividade enzimática no décimo quarto dia para exo-PG (32,3 U/g), no sexto dia (249 U/g) para endo-PG e no décimo dia (5090 U/g) para pectinaliase. Comparando com a fermentação usada com saquinhos de polipropileno, os valores de atividade enzimática obtidos foram cerca de 54%, 70% e 22% maiores para exo e endo-PG e pectinaliase, respectivamente, além da redução do tempo para tais valores.

Na ausência de aeração forçada, o fungo utilizado produziu diferentes proporções de atividade enzimática de pectinase nos dois biorreatores utilizados. PANDEY et al. (1996) usando biorreator de coluna para produção de

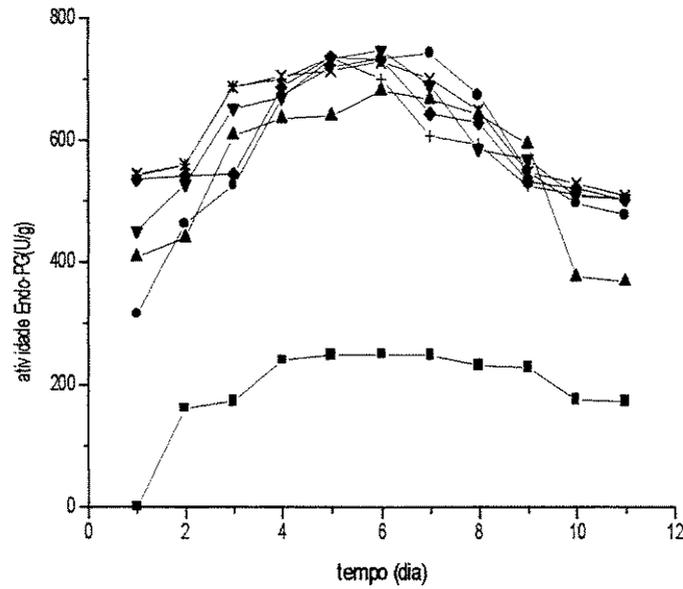
amiloglicosidase encontraram 50% de aumento na atividade em relação ao estudo com frascos de Erlenmeyer.

O meio de fermentação com 5 L/h de taxa de aeração comparado com os outros meios aerados, mostrou-se ineficiente para aerar as colunas para obter uma boa produção de enzimas. À partir da taxa de aeração de 10 L/h, houve maior crescimento do microrganismo e maior produção de enzimas, mostrando que as aerações acima de 10 L/h foram suficientes para aerar as colunas, com maior crescimento fúngico e maior produção de enzimas.

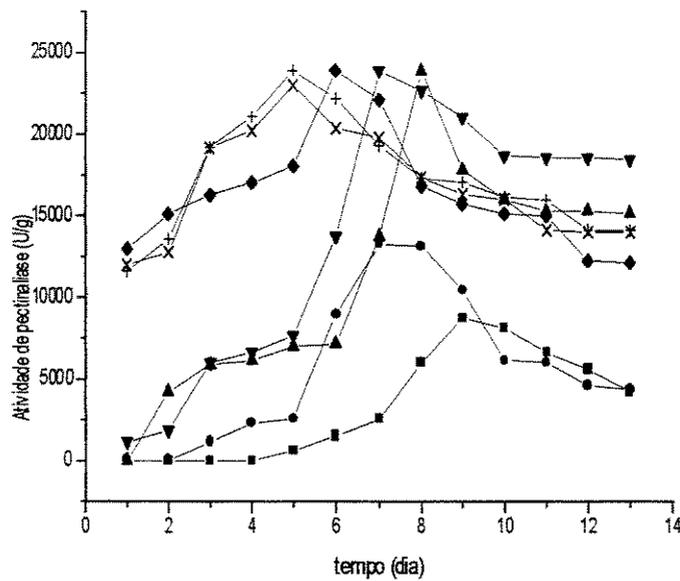
Por esses dados pode-se notar a importância da aeração para a produção das enzimas. Mesmo com pouca aeração (5 L/h) observa-se aumento de 34%, 80% e 66%, para exo e endo-PG e pectinaliase, respectivamente, comparando com o meio sem aeração.



**Figura 4.2.1.** Atividade de Exo-PG de *P. italicum* em reator de coluna (- ■ - sem aeração; - ● - 5 L/h; - ▲ - 10 L/h; - ▼ - 15 L/h; - ◆ - 20 L/h; - + - 25 L/h; - x - 30 L/h)..



**Figura 4.2.2.** Atividade de Endo-PG de *P. italicum* em reator de coluna ( - ■ - sem aeração; - ● - 5 L/h; - ▲ - 10 L/h; - ▼ - 15 L/h; - ◆ - 20 L/h; - + - 25 L/h; - x - 30 L/h)..



**Figura 4.2.3.** Atividade de Pectinase de *P. italicum* em reator de coluna ( - ■ - sem aeração; - ● - 5 L/h; - ▲ - 10 L/h; - ▼ - 15 L/h; - ◆ - 20 L/h; - + - 25 L/h; - x - 30 L/h)..

Pelas Figuras 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, pode-se observar que para a enzima exo-PG o valor máximo de atividade obtido foi de 261 U/g no sétimo dia de fermentação com vazão de ar de 10 L/h. Para endo-PG o valor máximo obtido foi de 747 U/g no sexto dia de fermentação com a vazão de 15 L/h e para pectinálise foi de 23912 U/g no sexto dia de fermentação com vazão de 20 L/h. Nos outros experimentos a diferença dos valores de atividade foram insignificantes, apresentando valores bem próximos em todos os experimentos realizados com vazões de ar superiores a 10 L/h.

No reator com vazão de ar de 30 L/h observa-se pequena redução nas atividades enzimáticas. GUMBIRA-SAID et al. (1993) observou que altas taxas de aeração causa abrasão e ruptura do micélio, provocando redução na atividade enzimática. Por outro lado, outros autores (PANDEY e RADHAKRISHNAN, 1992; GHILDYAL et al., 1994) detectaram acréscimo de atividade enzimática com aumento das vazões.

Durante o processo de fermentação foi observado visualmente um aumento de umidade nas colunas. COSTA (1996) também observou aumento na umidade durante o processo fermentativo, onde a umidade inicial de 55% aumentou cerca de 8,08% e 11,6%. Segundo este autor, para tais processos, outros fatores contribuem para o aumento no conteúdo de umidade do meio como a eficiência de separação da água arrastada, oriunda da operação de saturação do ar. Este efeito pôde ser observado visualmente nas colunas com maiores aerações estudadas neste trabalho.

Alguns autores (YANG et al., 1993) alegam que o aumento de umidade é devido a produção de água metabólica ou à liberação de água resultante da oxidação dos carboidratos presentes. SARGANTIS et al. (1993) detectaram que tal aumento na umidade durante o processo de fermentação foi benéfico para o crescimento celular em processos de fermentação semi-sólida.

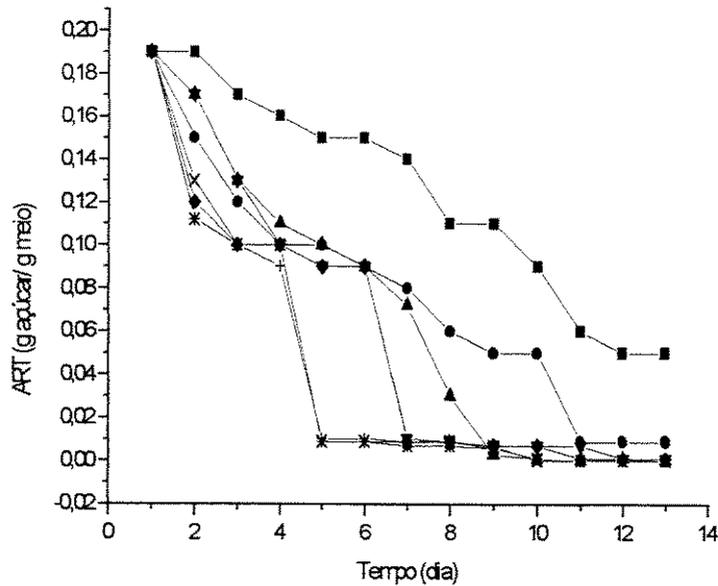
Durante todos processos fermentativos foi constatada redução na atividade enzimática a partir sexto - sétimo dia para os meios com aeração para todas enzimas estudadas, o que pode ser explicado pela presença de proteases, produzidas durante a fermentação (RAMAKRISHNA et al., 1994).

A Figura 4.2.4 mostra a variação da concentração de açúcares redutores totais para os meios utilizados com valores de vazões de ar diferentes. No começo da fermentação todos os meios apresentavam grande quantidades de açúcares, que foram metabolizados ao longo da fermentação. Observa-se pela figura que no meio sem aeração o fungo metabolizou os açúcares de forma lenta e uniforme até chegar a um valor bem reduzido.

Nos meios com aeração de 5 e 10 L/h os açúcares foram metabolizados de maneira distinta atingindo os mesmos valores após o nono dia de fermentação. Os meios com aeração de 15, 20, 25 e 30 L/h atingiram baixos valores após o sétimo dia, onde estes valores se igualaram. A comparação entre a produção de pectinases (Figuras 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3) e o consumo de açúcar redutor (Figura 4.2.4) pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, indica que a produção de pectinases aumentou com a redução de açúcar a níveis mínimos, o que ocorreu após o sexto/ sétimo dia de cultivo.

O consumo de açúcar redutor nos meios aerados sugerem uma maior produção de biomassa micelial, o que possibilitou a maior produção da atividade de pectinases observada nas colunas. O crescimento foi acompanhado visualmente.

RIZZATTO et al. (1999) observaram aumento na produção de pectinases em meios de fermentação com bagaço de laranja com 19% de açúcares redutores totais e bagaço de laranja com 1% de açúcares redutores, bem como bagaço com adição de açúcares (sacarose, frutose e galactose).

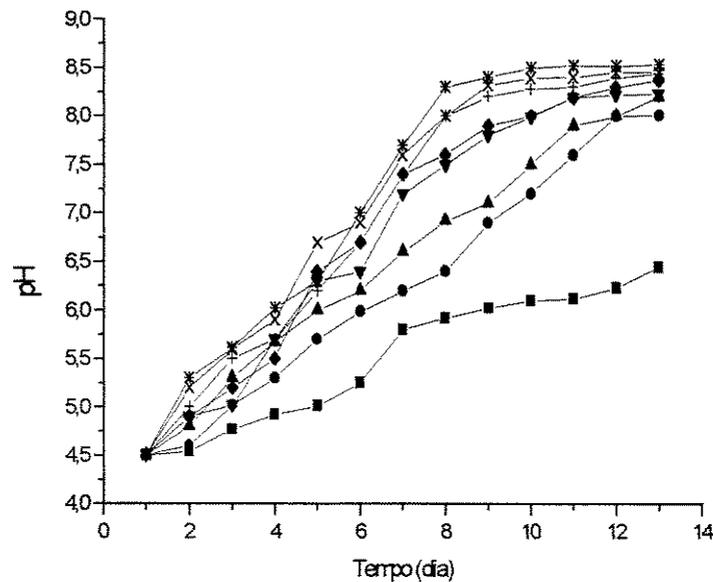


**Figura 4.2.4.** Açúcares redutores totais (ART) em meios fermentados em reator de coluna (- ■ - sem aeração; - ● - 5 L/h; - ▲ - 10 L/h; - ▼ - 15 L/h; - ◆ - 20 L/h; - + - 25 L/h; - x - 30 L/h)..

Foi observado por SILVA (2003) durante o processo fermentativo, que o consumo de açúcares prontamente assimiláveis presentes em grandes quantidades em alguns resíduos, promoveram melhor crescimento fúngico e sucesso na colonização do meio fermentativo. Entretanto, a redução desses açúcares do meio é importante para evitar a repressão catabólica e iniciar a produção da enzima, o que não foi observado por este mesmo autor que afirmou que a quantidade elevada de açúcares redutores presentes nos substratos utilizados (casca de manga e banana, polpa de maçã e bagaço de laranja) exerceram repressão sobre a produção de pectinases e apesar do intenso crescimento micelial, a quantidade da enzima produzida não foi significativa.

A Figura 4.2.5 mostra os valores de pH para todos os meios de fermentação. Observa-se que o aumento do pH durante toda a fermentação foi bastante acentuado. Esse aumento provavelmente ocorreu pela produção de proteases no meio de fermentação (o que foi confirmado pela Figura 6.1- capítulo

II) e por substâncias excretadas pelo microrganismo. Os valores máximos atingidos foram 6,7; 8,15; 8,25, 8,38; 8,44; 8,45 e 8,53 para os meios sem aeração, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 L/h, respectivamente.



**Figura 4.2.5.** pH dos meios fermentados por *P. italicum* em reator de coluna (- ■ - sem aeração; - ● - 5 L/h; - ▲ - 10 L/h; - ▼ - 15 L/h; - ◆ - 20 L/h; - + - 25 L/h; - x - 30 L/h)..

#### 4.3. Influência da densidade aparente do meio de cultivo

Após a preparação do substrato semi-sólido para o processo de fermentação, este pode sofrer variação na sua natureza fazendo com que ocorra variação na densidade aparente, causando uma compactação no meio semi-sólido. Essa compactação pode vir a limitar o processo fermentativo em reatores de coluna, dificultando a transferência de calor e massa principalmente em aumento de escala ("scale-up"). Este problema depende de vários fatores como o tipo de substrato e biorreator utilizado, assim como a acomodação do leito fixo.

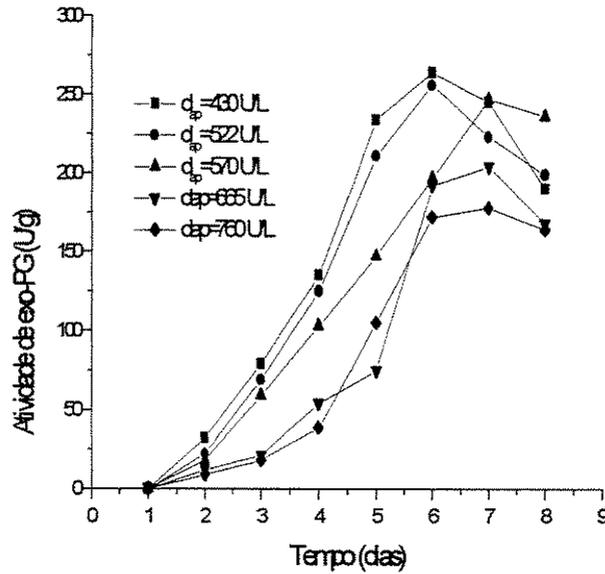
Foram realizados vários ensaios variando as densidades aparentes do meio ( $d_{ap}$ ) de fermentação semi-sólida, como descrito no item 3.4, com valores

extremos de 430 g/L a 760 g/L, onde a aeração dos meios fermentativos foi mantida em 20 L/h e a umidade de 55%. Não foi possível realizar ensaios com valores acima de  $d_{ap} = 760$  g/L, pois com a compactação ocorria interrupção na aeração, que quando aumentada arrastava o meio de forma pistonada.

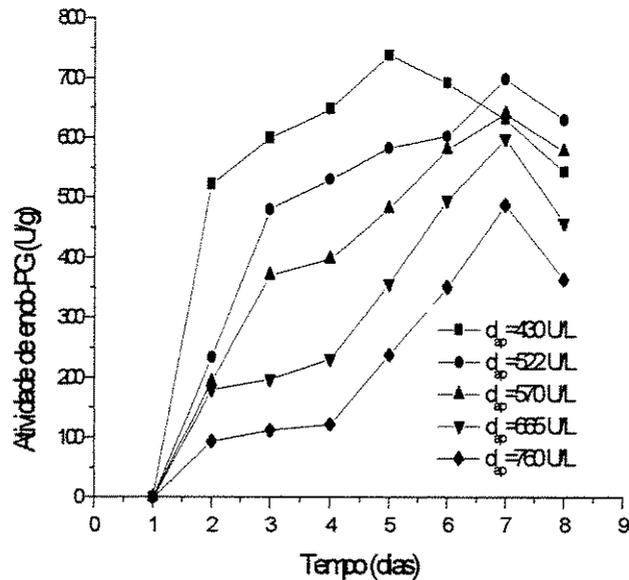
As Figuras 4.3.1 e 4.3.2 mostram o efeito da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) sobre a atividade enzimática de exo e endo-PG, ao longo do processo de fermentação do meio semi-sólido.

Pode-se observar pelas figuras que o meio com densidade aparente menor (430 g/L) foi o que permitiu obter maiores valores de atividade enzimática, 264 U/g no sexto dia de fermentação e 738 U/g no quinto dia de fermentação para exo e endo-PG, respectivamente. Foi observado ao longo do processo fermentativo, que quanto maior a densidade aparente do meio, menores foram os valores de atividade enzimática.

Comparando os meios com o meio de menor  $d_{ap}$ , observa-se que o meio com  $d_{ap} = 570$  g/L permitiu obter valores de exo de 93% e para endo-PG de 86%. Para os meios com  $d_{ap} = 665$  g/L e  $d_{ap} = 760$  g/L, foram obtidos valores para exo-PG de 77% e 67% e para endo-PG de 81% e 66%, respectivamente. Tais valores podem ser observados nas Figuras 4.3.1 e 4.3.2, onde comparam-se as curvas de atividade para as diversas densidades aparentes utilizadas.



**Figura 4.3.1.** Efeito da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) sobre a atividade de exo-PG ao longo do processo fermentativo.



**Figura 4.3.2.** Efeito da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) sobre a atividade de endo-PG ao longo do processo fermentativo.

Os meios com maiores  $d_{ap}$  apresentam maiores quantidades de substrato e conseqüentemente menor espaço entre as partículas. Isto afeta diretamente a aeração utilizada para dissipar o calor produzido durante o processo de fermentação, que ocorre devido às atividades metabólicas dos microrganismos e ao aumento da camada do substrato. As temperaturas elevadas afetam a germinação dos esporos, o crescimento, a esporulação dos microrganismos, o metabolismo e a formação de produtos. A dificuldade na remoção do calor foi maior nas colunas com maiores  $d_{ap}$ , o que foi observado durante todo o processo.

O substrato utilizado possuía uma granulometria variada, o que pode ser observada pela Tabela 4.1.2 (capítulo II); como continha partículas pequenas, elas podem ter ajudado na compactação do meio pela diminuição dos espaços interpartículas interferindo na aeração do meio e respiração microbiana, causando aquecimento e resfriamento desbalanceados. Assim, os meios com maiores  $d_{ap}$  foram os que tiveram menores valores de atividade enzimática.

COSTA (1996) realizou ensaios em fermentador de coluna com densidades diferentes de meio de cultivo para produção de amiloglicosidase utilizando farelo de arroz como substrato e também observou valores de atividade enzimática menores para  $d_{ap}$  maiores. Para  $d_{ap} = 499$  g/L e 924 U/L obteve-se 1342,3 U/g e 1274 U/g, respectivamente.

Para obtenção de amiloglicosidase utilizando como substrato farelo de trigo, PANDEY e RADHAKRISHNAN (1992), variaram as densidades aparentes dos meios fermentativos (320 a 400 g/L) e obtiveram melhor atividade no meio com  $d_{ap} = 350$  U/L.

Por outro lado, BARRIOS-GONZÁLEZ et al. (1993) observaram aumento de produção de penicilina produzida por *Penicillium chrysogenum* em meio semi-sólido, quando ocorria aumento da compactação do meio fermentativo.

## 6. CONCLUSÕES

- Durante o processo de fermentação, os meios com umidade de 55% e 60% mostraram-se eficientes para o crescimento do fungo e conseqüentemente para a produção das enzimas;
- A aeração foi de extrema importância na remoção do calor no interior da coluna e na produção das enzimas durante o processo de fermentação;
- As vazões entre 10 e 20 L/h foram as melhores para produção das enzimas com valor máximo de 261 U/g no sétimo dia de fermentação para exo-PG (10 L/h), 747 U/g e 23912 U/g para endo-PG (15 L/h) e pectinaliase (20 L/h), respectivamente, ambas no sexto dia de fermentação;
- Quanto maior a densidade do meio de fermentação, menor é o crescimento microbiano e conseqüentemente menor a atividade enzimática;
- O meio com  $d_{ap} = 430$  g/L foi o que obteve maiores valores de atividade enzimática, 264 U/g e 738 U/g para exo e endo-PG, respectivamente.

## **CAPÍTULO IV**

**ESTUDO DAS VARIAÇÕES DE TEMPERATURA NO  
REATOR DE COLUNA, DETERMINAÇÃO DA MASSA DE CO<sub>2</sub> e  
CONDUTIVIDADE TÉRMICA**

## 1. INTRODUÇÃO

Na fermentação semi-sólida, o controle de determinados parâmetros faz-se necessário. A temperatura é um parâmetro de grande importância durante o processo fermentativo, pois ao longo do processo uma grande quantidade de calor é gerado devido às atividades metabólicas produzidas pelos microrganismos. Esse calor se não for dissipado durante a fermentação, afetará o crescimento do microrganismo, o metabolismo e a formação de produtos. Esse controle pode ser realizado com a aeração com passagem de ar através do meio de cultura ou através de sistema de camisas com água refrigerante.

A baixa condutividade térmica do material e baixa umidade diminuem a transferência de calor, onde o tamanho das partículas e da camada sólida também influenciam na transferência de calor. O aumento da temperatura devido ao calor metabólico gerado pode atingir 3000 Kcal/Kg de substrato no centro do reator, com gradiente radial de  $5^{\circ}\text{C cm}^{-1}$ . Durante a fermentação a temperatura pode atingir  $80^{\circ}\text{C}$  e ser um fator limitante, podendo causar secagem do meio diminuindo a atividade de água e a eficácia dos nutrientes (BELLON-MAUREL et al., 2003).

Outro método utilizado para o controle da temperatura é o uso de material inerte no substrato que pode ser natural ou sintético. Esses materiais podem ser vermiculite, perlite, amberlite, grânulos de barro, polietileno e espuma de poliuretano, cânhamo, bagaço de cana-de-açúcar, de milho, casca de arroz, entre outros. A desvantagem do uso de material inerte natural é que durante a fermentação com o crescimento do microrganismo, o meio sólido é degradado, resultando em mudanças nas características geométricas e físicas do meio, ocorrendo evaporação da água, formação de canais e conseqüentemente redução da transferência de calor e massa. Essa desvantagem pode ser controlada com o uso de material inerte com estrutura física mais ou menos constante em todas as partes do processo facilitando o controle da transferência de calor e massa (BARRIOS-GONZALES et al., 1996; WEBER et al., 1999; OOIJKAAS et al., 2000).

A massa celular é uma variável muito importante no controle dos processos de fermentação. No processo de fermentação semi-sólida a determinação do crescimento celular apresenta determinada dificuldade, pois o microrganismo não pode ser separado do meio semi-sólido e quantificado diretamente. Existem alguns métodos indiretos de determinação de biomassa em fermentação semi-sólida citados por alguns autores como: método que medem um certo constituinte celular como glicosamina, quitina, ácidos nucleicos e proteínas (GOMI et al., 1987; SMITS et al., 1996; ARAMAKI et al., 1995; RAIMBALT, et al, 1981) e métodos que medem o consumo de um nutriente como a estimativa de crescimento através da correlação com a taxa de consumo de oxigênio e/ou a produção de gás carbônico ao longo do processo (COSTA, 1996; MAIORANO et al., 1992; SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1994).

## **1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar as variações de temperatura no leito semi-sólido com diferentes densidades aparentes;
- Estudar a variação de temperatura usando material inerte;
- Determinar a condutividade térmica do material fermentado;
- Determinar a massa de CO<sub>2</sub> durante o processo fermentativo, como forma de avaliar o crescimento celular.

### **3. MATERIAL e MÉTODOS**

#### **3.1. Substrato para cultivo do fungo, caracterização e preparo**

O substrato utilizado, seu preparo e caracterização está descrito no item 3 do capítulo II.

#### **3.2. Microrganismo**

O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 como descrito no item 3.5 do capítulo II.

#### **3.3. SSF em reator de coluna**

Foram usados fermentadores de coluna com leito fixo como descrito no item 3.3 do capítulo III.

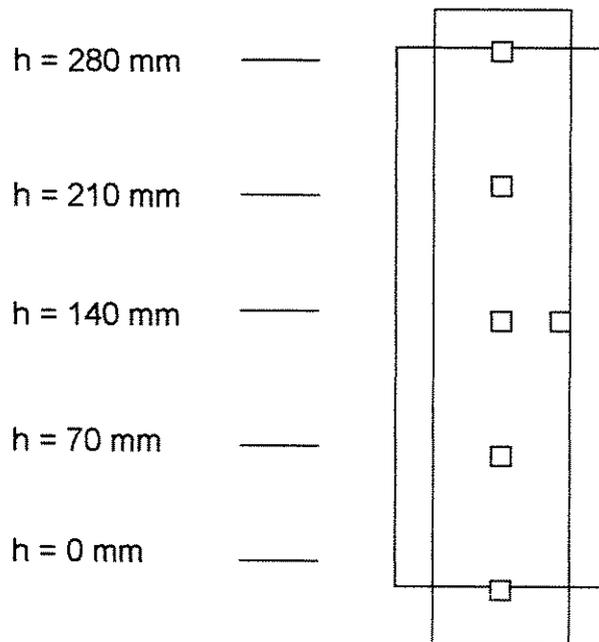
#### **3.4. Medidas de temperatura**

As medidas de temperatura foram feitas usando termopares de cobre-constantã (Tipo T) e um voltímetro que fornecia as leituras de temperaturas. A Figura 3.4.1 mostra a posição dos termopares nas colunas.

#### **3.5. Condutividade térmica**

Para medir a condutividade térmica (K) dos meios, foi utilizado o método a sonda em regime transiente. O equipamento é formado por uma fonte de tensão estabilizada, dois milivoltímetros digitais, um indicador digital de temperatura, uma resistência padrão e uma sonda. Esta sonda é formada por uma agulha hipodérmica de aço inox, em cujo interior foi introduzido um termopar de cobre-constantã e um fio resistivo envolto na parte externa da agulha. A sonda foi

calibrada medindo-se a condutividade térmica da água, acrescida de 2% de ágar para assegurar a não interferência de convecção.



**FIGURA 3.4.1.** Pontos de medições de temperatura do leito semi-sólido.

Para medir a condutividade térmica, foram usados os próprios reatores de coluna utilizados para os ensaios de fermentação com dimensões de 50 mm de diâmetro e 300 mm de comprimento (relação comprimento:diâmetro = 6). As amostras foram acondicionadas nas colunas e então inseriu-se a sonda, aguardando um tempo determinado até que a temperatura entrasse em equilíbrio. Usando uma chave comutadora, ajustava-se a corrente elétrica aplicada à resistência. A leitura da temperatura na sonda foi feita de 20 em 20 minutos.

Correlacionaram-se os dados pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a declividade "b" para cada experimento. A condutividade foi calculada a partir da equação:

$$b = \frac{Q}{4 \cdot \pi \cdot K} \quad (3.5.1)$$

onde,

$$Q = I^2 \cdot R \text{ (W)} \quad (3.5.2)$$

I = intensidade da corrente na sonda (A);

R = resistência da sonda ( $\Omega$ ).

Assim,

$$K = \frac{I^2 \cdot R}{4\pi b} \quad (3.5.3)$$

### **3.6. Determinação das variações de temperatura do leito semi-sólido utilizando material inerte**

Foram realizados ensaios de fermentação com densidades aparentes de 430 g/L e 522 g/L como descrito no item 3.4 (Capítulo III) utilizando como substrato inerte 10% de bagaço de cana em 90% de bagaço de laranja. Para todos os ensaios foram mantidas todas as condições normais de fermentação. Para o controle da temperatura os meios foram aerados com ar saturado, de 20 L/h, à temperatura de 28°C, água a 28°C no encamisamento da coluna e umidade do meio de 55%. Em todos os ensaios as temperaturas foram monitoradas com termopares distribuídos ao longo do reator como mostra o item 3.4.

### **3.7. Determinação da concentração celular nas fermentações semi-sólidas**

A estimativa de crescimento celular foi realizada segundo método apresentado por SATO et al. (1983) e adaptado por COSTA (1996) onde foi

utilizada a velocidade de formação de gás carbônico (medida conforme item 3.8), de acordo com o apresentado por NARAHARA et al. (1982) e COSTA (1996).

A partir dos valores obtidos para a condutividade elétrica ( $\lambda$ ) da solução de NaOH usada para a coleta do CO<sub>2</sub>, e usando uma curva de calibração de acordo com o indicado em 3.8, determinou-se o valor da normalidade desta solução para cada ponto de amostragem. Foi utilizada equação 3.7.1 para calcular a quantidade de CO<sub>2</sub> liberado.

$$M_{CO_2} = V_{NaOH} \cdot 22 \cdot (N_i - N) \quad (3.7.1)$$

onde:

$M_{CO_2}$  = massa de gás carbônico liberada durante a fermentação (g<sub>CO2</sub>);

$V_{NaOH}$  = volume de hidróxido de sódio usado para coleta do CO<sub>2</sub> liberado na fermentação;

$N_i$  = normalidade inicial da solução;

$N$  = normalidade da solução de NaOH no tempo de amostragem;

### 3.8. CO<sub>2</sub> produzido

A metodologia utilizada para a determinação do gás carbônico produzido durante as fermentações é descrita por CARRIZALEZ et al. (1981) e RODRIGUEZ et al. (1985).

O método é baseado na mudança da concentração de uma solução padrão de hidróxido de sódio, devido à absorção do gás carbônico da saída do fermentador, segundo a relação estequiométrica: CO<sub>2</sub> + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O. A

medição da mudança na condutividade elétrica da solução permite determinar a concentração do hidróxido de sódio em cada instante e, então, a quantidade de gás carbônico produzido durante um dado período de crescimento, uma vez que o ar de entrada era livre de CO<sub>2</sub>.

Utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio, aproximadamente 1 N, para receber o ar de saída de cada fermentador. A calibração foi feita pela medida da condutividade de diversas soluções padrões de hidróxido de sódio, com concentrações variando entre 0 e 1 N. Para cada experimento foi construída uma nova curva de calibração. A compensação nas mudanças de temperatura foi realizada pelo próprio condutivímetro Analyzer 650.

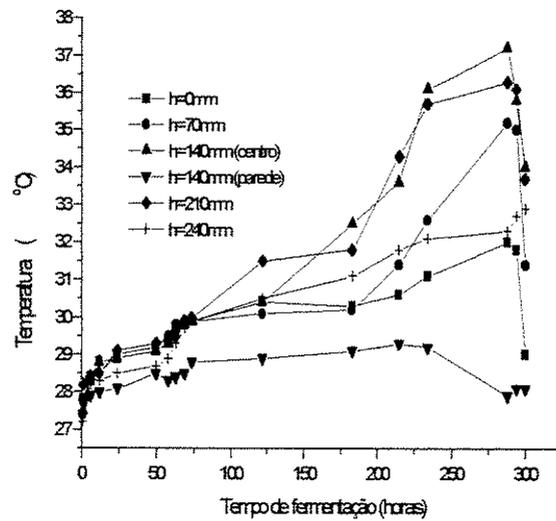
## **4. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

### **4.1. Variações na temperatura do leite semi-sólido com e sem aeração**

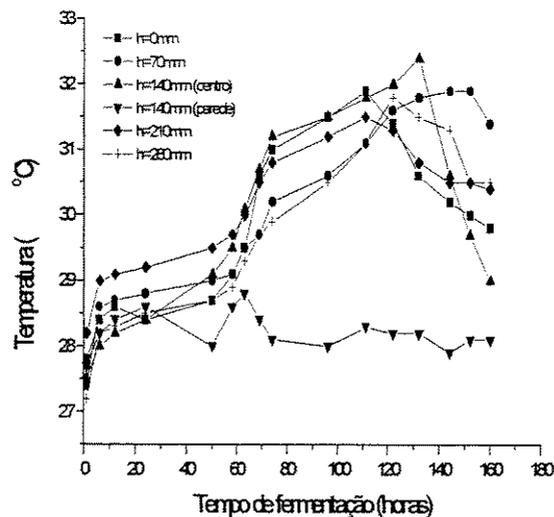
Durante o processo de fermentação ocorre a liberação de calor devido a atividade metabólica do fungo na produção enzimática. Esse aumento de temperatura pode causar vários problemas durante o processo de fermentação. Para evitar esse aumento de temperatura vários autores citam a necessidade de remoção desse calor (MODAK e RAJAGOPALAN, 1994; CASTAÑEDA et. al., 1992; OOIJKAAS et al., 2000; BELLON-MAUREL et al., 2003).

Foram realizados ensaios de fermentação com  $d_{ap} = 430$  g/L, onde no primeiro ensaio foram mantidas todas as condições normais de fermentação para o controle da temperatura com aeração com ar saturado de 20 L/h, fazendo com que a temperatura do ar no reator fosse de 28°C e banho com  $T = 28^\circ\text{C}$  no encamisamento da coluna. No segundo foi mantido somente o banho a 28°C no encamisamento fazendo com que diminuísse a remoção de calor por condução no interior da coluna e para ambos ensaios as temperaturas foram monitoradas com termopares distribuídos ao longo do reator, como mostra o item 3.4.

As Figuras 4.1.1 e 4.1.2 mostram os perfis de temperatura ao longo da coluna de fermentação enzimática. Pode-se observar que a temperatura do fermentador não aerado com ar saturado foi maior comparada com o fermentador com aeração forçada, confirmando a redução da remoção de calor no interior da coluna. A temperatura no centro da coluna foi de 37,2°C para a coluna sem aeração e 31,9°C para a coluna aerada.



**Figura 4.1.1.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido em função do tempo de fermentação para o ensaio sem aeração ( $d_{ap}=430$  g/L).



**Figura 4.1.2.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido em função do tempo de fermentação para o ensaio com aeração forçada ( $d_{ap}=430$  g/L).

Os valores máximos de temperaturas alcançada, mostram o aumento de temperatura gerado pelo calor metabólico liberado pelos fungos ao longo do processo de fermentação, reforçando a importância do mecanismo de remoção de calor ao longo do reator estudado. O calor produzido precisa ser dissipado para evitar aumentos na temperatura no interior da coluna que causam redução no crescimento do microrganismo e conseqüentemente retardamento e redução da atividade enzimática.

GHILDYAL et al. (1991) observaram que apenas a aeração foi suficiente para remover o calor e controlar a temperatura no meio de fermentação, o que não ocorreu no presente trabalho, pois pela Figura 4.1.1 observa-se que mesmo com aeração e encamisamento da coluna, se dissipou o calor gerado pelo fungo e nem reduziu a temperatura do meio a valores próximos a 28°C, que seria a temperatura ótima de crescimento do fungo em questão. Mas também foi observado que a temperatura de 31,9°C, não foi tão prejudicial ao crescimento do fungo, já que este teve bom crescimento e rendimento na produção de atividade enzimática.

COSTA (1996) observou que a aeração forçada do meio de fermentação para produção de amiloglicosidase, não foi suficiente para resfriar o meio e manter a temperatura em níveis considerados aceitáveis, onde entre 54 e 60 horas de fermentação, a temperatura do leito elevou-se até 51°C, distanciando-se muito do valor de 30°C, estabelecido como ótimo para o fungo *Aspergillus niger*.

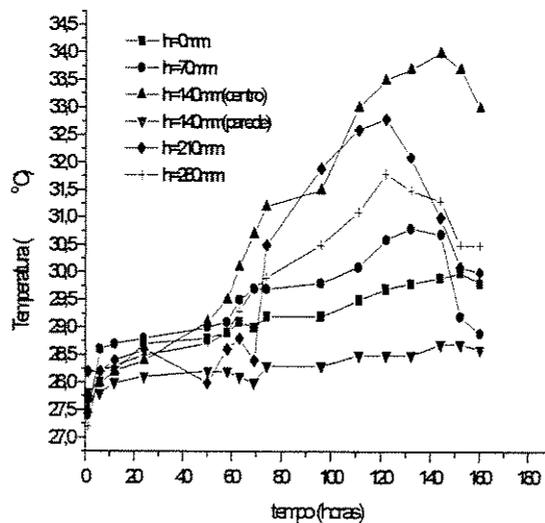
#### **4.2. Variações na temperatura do leito semi-sólido com diferentes densidades aparentes**

Foram realizados vários ensaios de fermentação com densidades aparentes diferentes (430 g/L, 522 g/L, 570 g/L, 665 g/L e 760 g/L). Para todos os ensaios foram mantidas todas as condições normais de fermentação. Para o controle da temperatura os meios foram aerados com ar saturado de 20 L/h à temperatura de 28°C, água a 28°C no encamisamento da coluna e umidade do

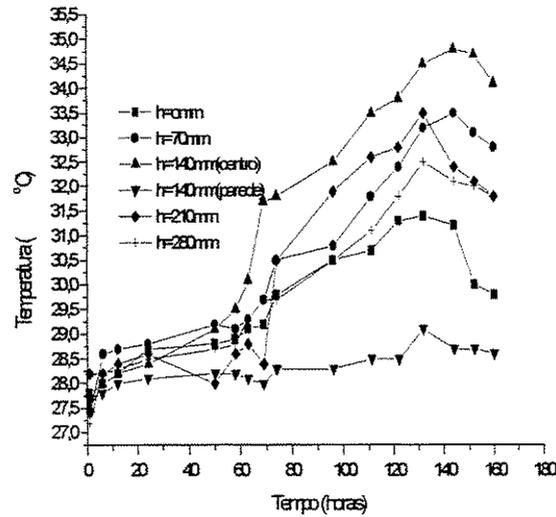
meio de 55%. Em todos os ensaios as temperaturas foram monitoradas com termopares distribuídos ao longo do reator como mostra o item 3.4.

As Figuras 4.1.2, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 mostram os perfis de temperatura ao longo da fermentação enzimática. Pode-se observar que as temperaturas ao longo da fermentação foram maiores nos ensaios com densidades aparentes maiores. O meio com menor  $d_{ap}$  (430 g/L) apresentou uma temperatura de 31,9°C no centro da coluna e o meio com maior  $d_{ap}$  (760 g/L) temperatura de 36,2°C, um aumento de 4,3°C.

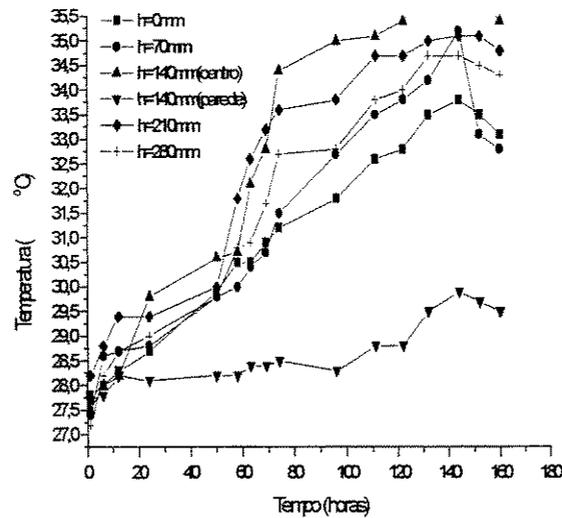
A simples comparação dessas figuras, mostra a importância do sistema de controle de temperatura, pois com a maior densidade aparente ( $d_{ap}=760$  g/L), ou a maior compactação do meio, a aeração arrastava o meio de forma pistonada, interrompendo assim a dissipação do calor metabólico gerado.



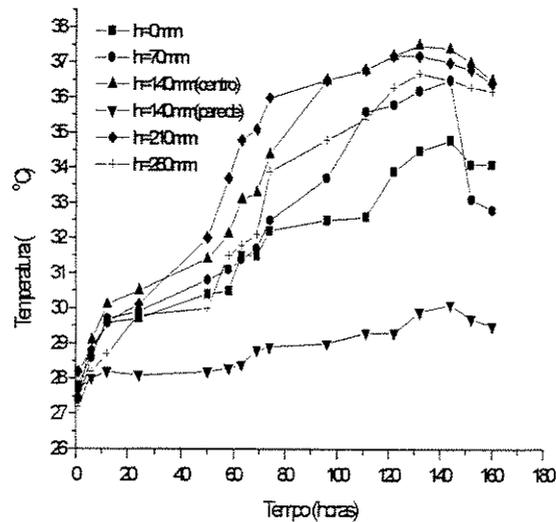
**Figura 4.2.1.** Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio ( $d_{ap}=522$  g/L)



**Figura 4.2.2.** Perfis de temperatura das diversas altura (h) do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio ( $d_{ap}=570$  g/L)



**Figura 4.2.3.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio ( $d_{ap}=665$  g/L)



**Figura 4.2.4.** Perfis de temperatura das diversas alturas ( $h$ ) do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio ( $d_{ap}=760$  g/L)

As maiores temperaturas em todos os meios de fermentação apresentaram-se na altura central ( $h=144$  mm) do reator e as menores na parede onde mantiveram-se com pequenas alterações ao longo da fermentação. Nas alturas de 70 mm e 210 mm as temperaturas apresentaram-se menores comparadas com as temperaturas centrais.

GOWTHAMAN et al. (1993) estudaram o gradiente de temperatura e concentração de gás em fermentação com reator de coluna ( $h=345$  mm e  $d=150$  mm) e observaram que na altura de 33 mm a temperatura do meio atingiu  $35^{\circ}\text{C}$  e nas alturas de 170 mm e 280 mm as temperaturas máximas foram de  $45^{\circ}\text{C}$  e  $47^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Concluíram que estes altos valores ocorreram devido a alta atividade metabólica do microrganismo e devido a má transferência convectiva do calor da parte inferior da coluna pelo ar ascendente. E no topo da coluna as temperaturas são menores pois ocorre troca de calor com a corrente de ar e ambiente.

Foi observado por IKASARI et al. (1999) em FSS, quando utilizaram casca de arroz para estudar o crescimento de *Rhizopus oligosporus*, que as variações de temperatura afetaram o crescimento do microrganismo devido a perda de umidade do substrato provocada pelas altas temperaturas.

COSTA (1996) estudou o perfil de temperatura em reator de coluna em FSS, e observou grande acréscimo na temperatura após 24 horas de fermentação e entre 54 e 60 horas, a temperatura do leito no ponto acima do centro da coluna elevou-se até 51°C, distanciando-se muito do valor de 30°C estabelecido como ótimo para o crescimento do *Aspergillus niger*. Como consequência deste afastamento da idealidade, o metabolismo do microrganismo foi prejudicado, e rapidamente a temperatura decresceu para níveis em torno de 30 - 35°C.

STUART et al. (1999) observaram aumento de temperatura ao longo da fermentação semi-sólida na produção de proteína em reator de coluna, onde a temperatura no meio com maior quantidade de substrato (3 Kg) foi de 35,5°C e para 1,5 Kg de substrato de 33,4°C.

Segundo BELLON-MAUREL et al. (2003) o aumento da temperatura causado pelo calor metabólico do microrganismo em crescimento, pode atingir cerca de 3000 Kcal/g de substrato no centro do reator. Durante o crescimento do microrganismo a temperatura pode atingir cerca de 80°C causando diminuição da umidade do substrato e consequentemente a redução da atividade de água e transferência de nutrientes acarretando no crescimento do microrganismo.

Esse problema talvez possa ser resolvido utilizando microrganismos termofílicos. KALOUGERIS et al. (1999) concluíram que o aumento de temperatura ao longo da fermentação semi-sólida em reator horizontal para produção de enzimas de microrganismos termofílicos foi insignificante, onde o crescimento deste manteve-se constante, comparado com trabalhos onde foi utilizado microrganismos mesofílicos.

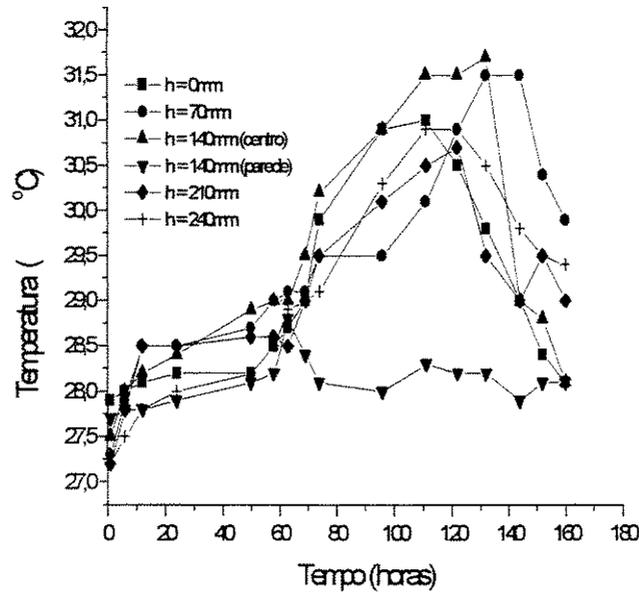
### **4.3. Variações na temperatura do leito semi-sólido utilizando material inerte no meio de fermentação**

Como discutido anteriormente no item 4.1, durante o processo de fermentação ocorre a liberação de calor devido a atividade metabólica do fungo na produção enzimática. Esse aumento de temperatura pode causar vários problemas durante o processo fermentativo. O uso de materiais inertes no substrato dissipam o calor metabólico gerado durante o crescimento do microrganismo, visto que esses materiais reduzem a compactação do meio de fermentação ao longo do processo, o que dificulta a passagem do ar saturado ao longo da coluna.

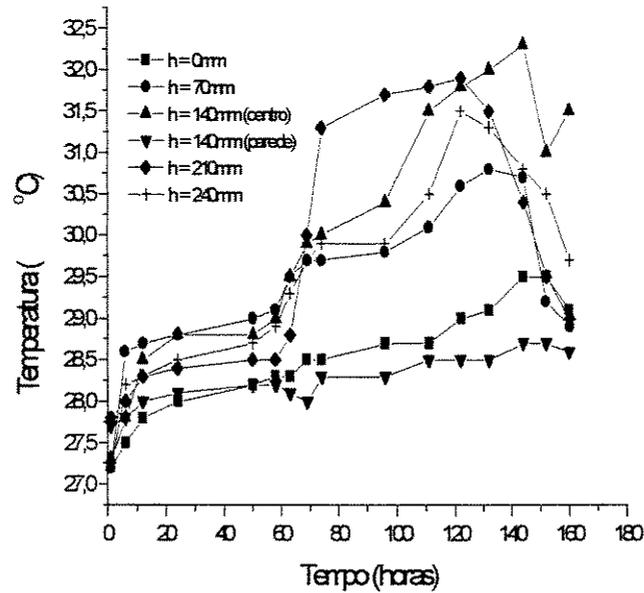
Foram realizados ensaios de fermentação com densidades aparentes de 430 g/L e 522 g/L utilizando como substrato bagaço de laranja (90%) e substrato inerte bagaço de cana (10%). Para todos os ensaios foram mantidas todas as condições normais de fermentação. Para o controle da temperatura os meios foram aerados com ar saturado de 20 L/h à temperatura de 28°C, água a 28°C no encamisamento da coluna e umidade do meio de 55%. Em todos os ensaios as temperaturas foram monitoradas com termopares distribuídos ao longo do reator como mostra o item 3.4.

As Figuras 4.1.2, 4.2.1, 4.3.1 e 4.3.2 mostram os perfis de temperatura ao longo da fermentação enzimática utilizando substratos com e sem material inerte com densidades aparentes de 430 g/L e 522 g/L.

Pode-se observar pelas figuras que as temperaturas ao longo da fermentação para os ensaios utilizando substratos com ou sem material inerte, foram próximas com máximas variações no centro da coluna de 0,7 °C para o



**Figura 4.3.1.** Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido utilizando material inerte no substrato ( $d_{ap} = 430$  g/L).



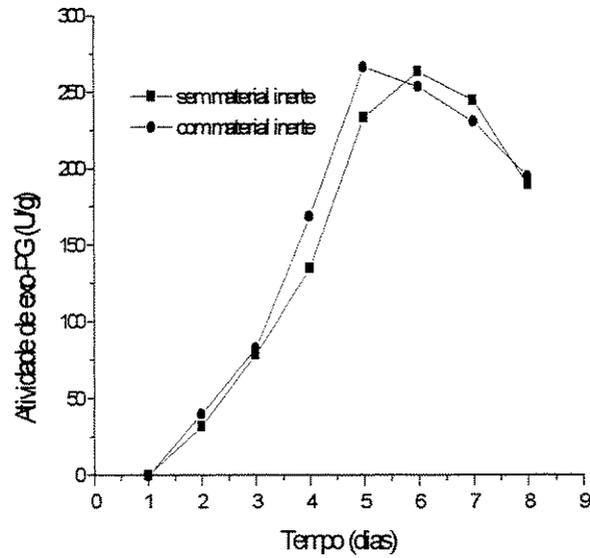
**Figura 4.3.2.** Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido utilizando material inerte no substrato ( $d_{ap} = 522$  g/L).

substrato com  $d_{ap} = 430$  g/L e  $1,7^{\circ}\text{C}$  para o substrato com  $d_{ap} = 522$  g/L. O meio com  $d_{ap} = 522$  g/L utilizando material inerte obteve perfil de temperatura semelhante ao meio com  $d_{ap} = 430$  g/L sem substrato inerte, mostrando que o material inerte contribuiu para a dissipação de calor gerado durante o processo fermentativo, liberando passagens para o ar saturado que alimenta a coluna ao longo do processo de fermentação.

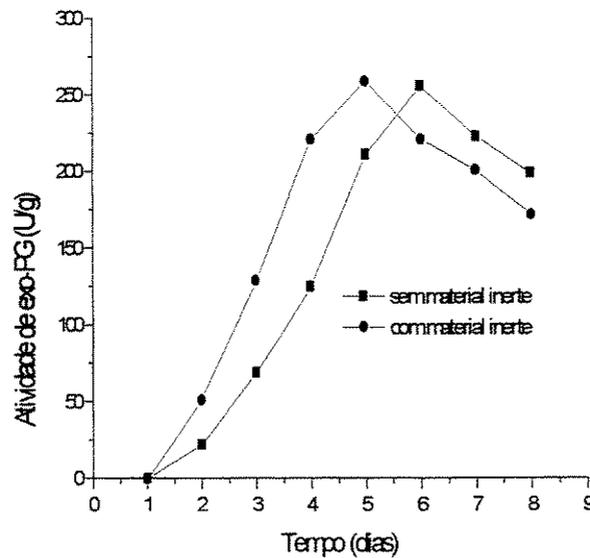
As Figuras 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5 e 4.3.6 mostram os valores de atividade enzimática para exo e endo-PG ao longo da fermentação com e sem material inerte.

Pode-se observar pela figura 4.3.3 valores máximos de atividade enzimática de exo-PG de 264 U/g no sexto dia de fermentação para o substrato sem material inerte e 267 U/g no quinto dia de fermentação para o substrato com material inerte, ambos com  $d_{ap} = 430$  g/L. Na figura 4.3.6 com  $d_{ap} = 522$  g/L observa-se atividade máxima no sexto dia de fermentação de exo-PG de 256 U/g para o substrato sem material inerte e 259 U/g para o substrato com material inerte. Observa-se uma diferença de 3U/g de atividade enzimática de exo-PG nas fermentações com e sem material inerte em ambas densidades aparentes (430 e 522 g/L).

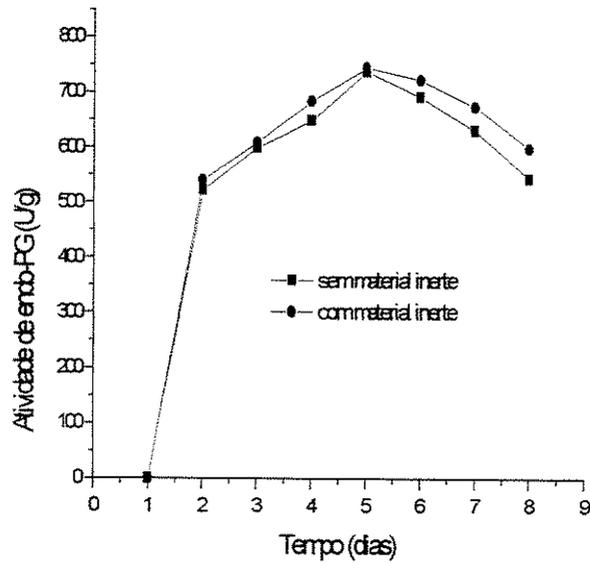
A figura 4.3.5 mostra atividade enzimática de endo-PG para os substratos com e sem material inerte ( $d_{ap} = 430$  g/L), onde observa-se máxima atividade de 738 U/g para o meio sem material inerte e 765 U/g para o meio com material inerte, ambos no quinto dia de fermentação, uma diferença de 27 U/g. Para o meio com  $d_{ap} = 522$  g/L (Figura 4.3.6), observa-se máxima atividade enzimática de endo-PG de 699 U/g no sétimo dia de fermentação para o meio sem material inerte e 729 U/g no quinto dia de fermentação para o meio com material inerte, mostrando uma diferença de 30 U/g. Pode-se observar que a dissipação de calor e a redução da temperatura no meio com material inerte contribuiu para o aumento de 5% da atividade enzimática de endo-PG.



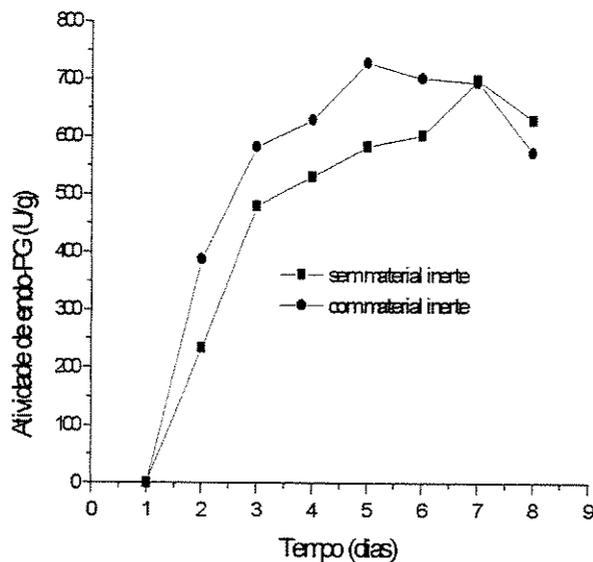
**Figura 4.3.3.** Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte ( $d_{ap} = 430$  g/L) (-■ - sem substrato inerte; -● - com substrato inerte)



**Figura 4.3.4.** Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte ( $d_{ap} = 522$ g/L) (-■ - sem substrato inerte; -● - com substrato inerte)



**Figura 4.3.5.** Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte ( $d_{ap} = 430$  g/L) (-■ - sem substrato inerte; -● - com substrato inerte)



**Figura 4.3.6.** Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem substrato inerte ( $d_{ap} = 522$  g/L) (-■ - sem substrato inerte; -● - com substrato inerte)

OOIJKAAS et al. (2000) estudaram o uso de material inerte em FSS e observaram que substratos naturais possuem fontes de carbono em sua estrutura e que ao longo da fermentação o meio sólido é degradado pelo microrganismo resultando em mudanças nas características e na geometria física do meio, causando canais preferenciais e conseqüentemente reduzindo a umidade do substrato e diminuindo a transferência de calor e massa. O uso de material inerte não causaria mudanças na estrutura física do meio facilitando o controle durante a fermentação, o que não foi observado neste trabalho, onde a diferença de temperatura e a dissipação do calor no interior da coluna nos meios com e sem material inerte foram pequenas e não influenciaram significativamente nos valores de atividade enzimática.

Vários autores estudaram o uso de material inerte em FSS: uso de bagaço de cana para produção de pectinases (ACUNÁ-ARGUELLES et al., 1994; SOLIS-PEREIRA et al., 1996); casca de arroz para produção de amiloglucosidase (COSTA, 1996) e espuma de poliuretano para produção de amilases (MURADO et al., 1997).

### **5. Condutividade térmica do meio de fermentação**

A condutividade térmica foi determinada em meios não fermentados com densidades aparentes diferentes (475, 570 e 760 g/L), variando a umidade dos meios (50%, 55% e 60%), possibilitando assim estudar a influência exercida pela densidade aparente e umidade do meio (item 3.3, capítulo III). Foram determinadas também as condutividades térmicas de meios fermentados com densidades aparentes diferentes (475, 570 e 760 g/L) e umidade de 55% para todos os meios. Os valores de condutividade térmica em relação a densidade aparente dos meios não fermentados e variações de umidade estão listadas na Tabela 5.1 e os valores dos meios fermentados na Tabela 5.2.

Pelas Tabelas 5.1 e 5.2 pode-se observar um acréscimo da condutividade térmica (K) com o aumento da  $d_{ap}$  dos meios fermentados e não fermentados, onde os valores de K para os meios fermentados foram maiores, quando comparados com os meios nas mesmas condições não fermentados. Observa-se também pela Tabela 5.1 que a elevação de K, com o aumento da umidade do meio, ocorreu de maneira menos acentuada. COSTA (1996) observou os mesmos resultados quando determinou a condutividade térmica de meios fermentados de casca de arroz, variando também a  $d_{ap}$  e umidade.

**Tabela 5.1.** Condutividade térmica (K) em relação a densidade aparente ( $d_{ap}$ ) dos meios não fermentados e umidade.

Umidade (%)	Densidade aparente (g/L)	Condutividade térmica (w/m°C)
50	430	0,356
55	430	0,36
60	430	0,367
50	570	1,14
55	570	1,147
60	570	1,15
50	760	1,245
55	760	1,25
60	760	1,259

**Tabela 5.2.** Condutividade térmica (K) em relação a densidade aparente ( $d_{ap}$ ) dos meios fermentados.

Umidade (%)	Densidade aparente (g/L)	Condutividade térmica (w/m°C)
55	430	0,58
55	570	1,16
55	760	1,19

A condutividade térmica de materiais sólidos varia de acordo com material, temperatura e teor de umidade (PARK et al., 1999). No presente trabalho, como já citado anteriormente, a variação da condutividade térmica com aumento da umidade não foi significativa, observando que a variação ocorreu com o aumento da densidade aparente do meio.

Na literatura não foram encontrados quaisquer estudos referentes à condutividade térmica de meios semi-sólidos fermentados, exceto o trabalho de COSTA (1996).

Vários autores correlacionaram a condutividade térmica de vários materiais com o conteúdo de umidade: batata - MURR (1992) e LOPES FILHO (1988); vários alimentos - SWEAT (1986); maçã - LOZANO et al. (1979).

PARK et al. (1997) determinaram a condutividade térmica de milho triturado pelo método da sonda e observaram comportamento anisotrópico durante a determinação dos ensaios. Para partículas menores de milho triturado, observaram aumento de  $K$  com o aumento da compactação e aumento da umidade.

Para determinar a condutividade térmica de arroz em casca e trigo, PARK et. al. (1999) utilizaram um equipamento com termopares de cobre-constantã dispostos radialmente no interior do cilindro, conectados a uma unidade registradora de dados acoplados a um microcomputador.

Foi estudado o efeito da temperatura e da umidade na condutividade térmica de farinha de milho e grânulos de batata de diferentes densidades e foi observado que a densidade para o milho tinha pouca influência no valor final da condutividade, sendo que os valores para grânulos de batata mostraram maior dependência com a densidade (HALLIDAY et. al. 1995).

## 6. Determinação da massa de gás carbônico nas fermentações semi-sólidas

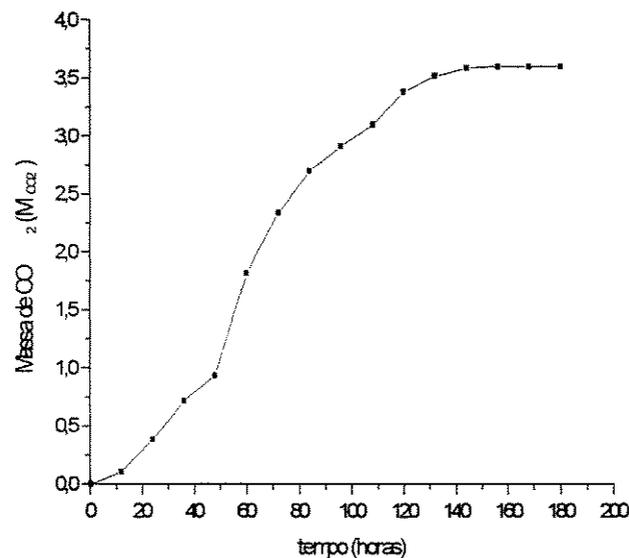
A determinação da massa de gás carbônico nas fermentações semi-sólidas foi realizada nas colunas com  $d_{ap}$  do meio de 430 g/L e vazão de ar de 20 l/h. A corrente de ar que alimentou cada coluna foi borbulhada em um frasco contendo água estéril, seguido por outro contendo KOH 33% p/p, pois o ar umidificado injetado nas colunas teria que estar livre de gás carbônico. O ar de saída dos fermentadores foi coletado ao longo da fermentação em uma solução de 250 mL de hidróxido de sódio 1 N e as medidas de condutividade elétrica foram feitas de 12 em 12h através do condutivímetro ANALIZER 650. O método utilizado foi baseado na mudança de concentração da solução padrão de hidróxido de sódio, devido à absorção do gás na saída dos fermentadores, segundo a relação estequiométrica:



A medida da mudança na condutividade elétrica da solução permitiu determinar a concentração do hidróxido de sódio em cada instante e, então, a quantidade de gás carbônico produzido durante um dado período de crescimento, uma vez que o ar de entrada era livre de  $\text{CO}_2$ .

A Figura 6.1 mostra os valores calculados de  $M_{\text{CO}_2}$  em função do tempo de fermentação, onde pode-se observar que ao longo da fermentação, com o crescimento do microrganismo, a massa de gás carbônico aumentou significativamente até o sexto dia de fermentação e, após, os valores da massa de gás carbônico tornaram-se constantes indicando redução do crescimento dos microrganismos, onde iniciou-se o processo de autólise do micélio e consequentemente redução da massa de  $\text{CO}_2$ .

Comparando a massa de gás carbônico com a atividade enzimática nas mesmas condições de fermentação (Figuras 4.1.1 e 4.1.2, capítulo III), pode-se observar que o crescimento celular, medidos em massa de gás carbônico, foi similar ao da atividade enzimática, onde os maiores valores ocorreram no quinto e sexto dia de fermentação indicando que a produção da enzima pectinase ocorre de forma associada ao crescimento do *P. italicum* IZ 1584 mostrando assim o término da fermentação. COSTA (1996), pesquisando o crescimento celular de *Aspergillus niger* em farelo de arroz para a produção de amiloglicosidase em FSS, observou também o crescimento do fungo associado a produção enzimática.



**Figura 6.1.** Massa de CO<sub>2</sub> em função do tempo de fermentação.

Segundo RAIMBAULT et al. (1998) o consumo de oxigênio e produção de CO<sub>2</sub> são o resultado da respiração e do processo metabólico aeróbico dos microrganismos, derivado da sua energia de crescimento. Esta atividade metabólica está diretamente associada com seu crescimento e pode ser utilizada para estimar a síntese de biomassa. A atividade metabólica em FSS é muito importante para os estudos dos aspectos teóricos e práticos da medida de crescimento e produção de biomassa pelos fungos. Vários autores reportaram dados de experimentos de laboratórios e ampliação de escala (RAIMBAULT, 1981; DESCHAMPS et al., 1982; BAJRACHARYA e MUDGETT, 1980).

## 7. CONCLUSÕES

- O material inerte (bagaço de cana), quando a 10% (p/p) do substrato utilizado a 10% (p/p) do substrato na fermentação semi-sólida, mostrou-se eficiente na dissipação do calor gerado pelo fungo ao longo do processo fermentativo;
- O crescimento celular, medido em massa de gás carbônico ao longo do processo fermentativo, teve perfil similar ao da atividade enzimática, indicando que a produção da enzima ocorre de forma associada ao crescimento do *P. italicum* IZ 1584;
- O sistema de controle de temperatura testado, mostrou-se de extrema importância, pois quanto maior a densidade aparente do meio de fermentação, maior é a temperatura gerada pelo calor metabólico liberado pelos microrganismos;
- A condutividade térmica do meio de fermentação é função direta da densidade aparente e da umidade do meio.

## **CAPÍTULO V**

**SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO - QUÍMICA DAS  
PECTINASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Penicillium*  
*Italicum* IZ 1584**

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas correspondem a um grupo de enzimas que atuam sobre substâncias pécicas através de reações de hidrólise e de trans-eliminação, provocando a despolimerização das moléculas e através de reações de desesterificação, hidrolisando a ligação éster entre os grupos carboxila e metil das pectinases (CECI e LOZANO, 1998).

Estas enzimas desempenham importante papel nas indústrias de alimentos. As pectinases ácidas geralmente são produzidas por linhagens fúngicas e são utilizadas na extração, clarificação e estabilidade de sucos, produção de vinhos, maceração de vegetais, etc. As pectinases alcalinas, geralmente, são produzidas por linhagens de *Bacillus* e utilizadas na degomagem de fibras naturais, extração de óleos, fermentação de chá e café, etc (KASHYAP et al., 2001).

As preparações comerciais de pectinases geralmente contêm mistura de poligalacturonase, pectinaesterase e pectinaliase, sendo esta última, a única enzima capaz de hidrolizar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, como a pectina de maçã. Para aplicação destas enzimas em alimentos, os materiais que possuem pH próximo a neutralidade precisam ser acidificados, como ocorre na produção de purês e pastas de vegetais. Na extração ou clarificação de sucos, no qual muitas frutas e derivados possuem pH natural semelhantes ao ótimo de atuação da enzima, não há necessidade de correção do pH antes da sua aplicação (SILLEY, 1986; BRAVO et al., 2000).

Por outro lado, o processo de degradação da pectina presente no suco com as enzimas disponíveis no mercado, resulta na descaracterização do sabor da fruta, pois esses complexos pectinolíticos, contendo poligalacturonase e pectinaesterase, promovem além da quebra da pectina, a sua desesterificação, ocorrendo volatinização dos ésteres responsáveis pelo sabor. O uso da mistura

que contém pectinaesterase promove decréscimo da estabilidade do suco de fruta pela precipitação dos derivados da pectina desesterificada com íons de cálcio presentes no suco e liberação de metanol. Se o processo for feito apenas com pectinaliase, a formação de metanol não é detectada no suco (ALÃANA et al., 1989; ALÃANA et al., 1990; ISHII e YOKOTSUKA, 1971).

Desse modo, as propriedades físico-químicas de uma enzima destinada a indústria é de fundamental importância, uma vez que cada material processado possui características próprias, como pH, consistência, etc., e requer processo adaptado ao mesmo. A purificação e caracterização individuais das enzimas facilita o conhecimento de suas especificidades pelos substratos, a estabilidade destas perante a vários pHs e temperaturas de processamento. Durante várias décadas o estudo da purificação de pectinases tem sido realizado por diversos métodos, e a literatura mostra toda atenção voltada para novas técnicas e métodos.

### **Cromatografia**

Segundo ROBYT e WHITE (1990) a cromatografia é a separação de substâncias químicas dividindo-se entre dois meios, onde uma fase é estacionária e a outra móvel. A primeira pode ser um sólido ou um líquido e a segunda pode ser um líquido ou gás. As substâncias a serem separadas são distribuídas entre a fase estacionária e a móvel. Diferentes substâncias são distribuídas para diferentes graus e são deste modo separadas uma da outra.

A principal aplicação da cromatografia é na separação de misturas de compostos para propósitos analíticos e preparativos. O processo, também pode servir na identificação, isolamento, purificação e quantificação de compostos individuais. Estas aplicações, podem ser usadas na determinação da homogeneidade de substâncias químicas, na determinação da estrutura

molecular, na determinação de produtos de reação e especificidade enzima-substrato, e no monitoramento de processos e produtos químicos e bioquímicos.

### **Precipitação**

A precipitação pode ser realizada principalmente por sais e por solventes orgânicos. A precipitação de proteínas com sais depende principalmente, do caráter hidrofóbico da proteína. A presença de íons de sais na solução aquosa de proteínas diminui o poder de solvatação da proteína, assim, as áreas hidrofóbicas da proteína ficam expostas e interagem umas com as outras formando agregados que se precipitam (ROBYT e WHITE, 1990). O uso de soluções de altas concentrações salinas interfere na interação proteína-água, que passa a interagir com o sal, promovendo a precipitação da macromolécula protéica. Então, ocorre a neutralização das cargas da superfície da proteína pelo sal e pela diminuição efetiva da concentração de água (DEUTSCHER, 1990). O procedimento básico para esse tipo de precipitação envolve a dissolução do sal na solução contendo a proteína ou pela adição de uma solução saturada de sal. A faixa de concentração salina ou saturação a ser usada é alcançada experimentalmente para cada tipo de proteína em estudo. O sal mais usado é o sulfato de amônio, o qual apresenta alta solubilidade em água. Uma solução de sulfato de amônio é saturada a 4 M ou 528 g/L. As vantagens para o uso do sulfato de amônio são que o seu uso em alta molaridade precipita a maioria das proteínas, o calor da solução é facilmente dissipado, as soluções concentradas previnem ou limitam o crescimento bacteriano e quando o sulfato de amônio está em solução preserva as proteínas da desnaturação (DEUTSCHER, 1990).

### **Diálise**

A diálise é uma das técnicas mais antigas para remoção de solutos de baixo peso molecular ou para a troca de tampão (SCOPES, 1994; ROYER, 2000). O método é baseado nas propriedades de uma membrana semipermeável que

separa a solução de proteínas do tampão de diálise. O processo de diálise é dirigido pela diferença de concentração dos solutos dos dois lados da membrana. Quando o equilíbrio de concentrações é atingido, a difusão dos solutos fica a mesma em ambas as direções (SCOPES, 1994).

As membranas de diálise estão disponíveis em uma variedade de materiais e de tamanhos de poros. Os materiais mais comuns são colodion, celofane e celulose. A diálise é mais usada para a remoção de sais e de outras moléculas pequenas de uma solução de macromoléculas. Durante a separação e purificação de biomoléculas, pequenas moléculas são adicionadas para precipitar ou dissolver, seletivamente a molécula de interesse. Por exemplo, proteínas são freqüentemente precipitadas pela adição de solventes orgânicos ou sais como sulfato de sódio ou sulfato de amônio. Como a presença de substâncias orgânicas ou sais, geralmente interferem na purificação e caracterização futuras da molécula, eles devem ser removidos. A diálise é um método simples, barato e efetivo para a remoção total de moléculas pequenas, sejam elas iônicas ou aniônicas. A diálise também pode ser utilizada para dissociar os cofatores de proteínas tais como NAD, FAD e íons metálicos. A remoção dos íons metálicos é facilitada pela adição de um agente quelante, o EDTA, à solução a ser dialisada (ROYER, 2000).

### **Cromatografia de gel filtração**

Segundo ALVES-PRADO (2002) a cromatografia de gel, algumas vezes chamada de gel filtração, foi introduzida em 1959 com o uso de dextranas de ligação cruzada como um material para desalinização de macromoléculas e afetando grupos de separação baseado nos pesos moleculares. A técnica tem sustentado um método muito brando para purificação de enzimas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. O método separa as molécula de acordo com seu peso molecular.

Neste tipo de cromatografia, as partículas do gel formam uma fase estacionária, a fase móvel é a solução de moléculas a ser separadas e o solvente de eluição, que mais freqüentemente é a água ou um tampão. Se as moléculas forem grandes para os poros, elas nunca entram no gel e movem-se por fora do leito do mesmo com o solvente de eluição. Portanto, moléculas maiores da amostra movem-se mais rapidamente entre o leito do gel por serem eluídas em primeiro lugar. As moléculas menores, as quais podem entrar nos poros do gel, são retardadas e movem-se mais lentamente no leito do gel. Portanto, na cromatografia em gel, as moléculas são eluídas em ordem decrescente de tamanho molecular.

Os géis são relativamente inertes, constituídos de polímeros de ligações cruzadas. Diferentes graus de ligações cruzadas originam diferentes tamanhos de poros, diferentes malhas moleculares ou faixas de separação. Três tipos de polímeros são mais usados: dextrana, poliacrilamida e agarose.

A dextrana é um polissacarídeo composto de resíduos de glicose ligados por ligações  $\alpha$ -1,6 com ligações ramificadas do tipo  $\alpha$ -1,3. Ela é sintetizada a partir da sacarose por uma enzima produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. As dextranas de ligação cruzada são comercialmente produzidas pela Pharmacia Fine Chemicals Inc., (Uppsala, Suécia) e vendidas com o nome de *Sephadex*. Os géis *Sephadex* estão incluídos na série G, onde o G-número se referem a quantidade de água adquirida quando as contas são hidratadas na água, apresentando diferentes graus de ligações cruzadas levando a diferentes tamanhos de poros. Estes géis permitem que se tenha uma capacidade de separar diferentes faixas de pesos moleculares e tem diferentes limites de exclusão molecular. O limite de exclusão é o peso molecular do menor peptídeo ou proteína globular que não entrará no poro do gel. A *Sephadex G-10*, é a dextrana com mais ligações cruzadas. Tem uma retenção de água de aproximadamente 1 mL/g de gel seco e a *Sephadex G-200*, que é a dextrana com

menos ligações cruzadas, tendo uma retenção de água de aproximadamente 20 mL/g de gel seco, no processo de hidratação.

Os géis de poliacrilamida são polímeros longos de acrilamida com ligações cruzadas com N,N'-metileno-bisacrilamida. Os géis são comercialmente produzidos pela BioRad Laboratories, Richmond, Califórnia, como o Bio-Gel série P. Como a Sepharose série G, os Bio-Géis diferem no grau de ligações cruzadas e no tamanho do poro. Os Bio-Géis entretanto, tem uma ampla faixa dos tamanhos de poros que está disponível na série Sephadex G.

A agarose é uma fração de polissacarídeo neutro do ágar, com poros de tamanhos tão grandes quanto ao da dextrana ou da poliacrilamida com ligações cruzadas. Ela é composta de um polímero linear de D-galctopiranosose unida por ligação  $\beta$ -1,4 ao 3,6-anidro-L-galactopiranosose, a qual está ligada por  $\alpha$ -1,3. Quando o polissacarídeo é dissolvido em água fervente e resfriado, ele forma um gel unido por pontes de hidrogênio inter e intra-moleculares. O tamanho dos poros são controlados pela concentração de agarose. Materiais de alto peso molecular, tais como agregados de proteínas, DNA cromossomal, ribossomos, e células, têm sido fracionados em géis de agarose.

Como as separações através da cromatografia de gel filtração são baseados nos diferentes tamanhos moleculares, ele pode ser usado tanto para propósitos preparativos como analíticos, sendo que, este último, têm sido especialmente usado na determinação do peso molecular de proteínas.

A cromatografia de gel filtração sustenta um método rápido e brando de remoção dos sais e outras pequenas moléculas a partir do peso molecular das biomoléculas. A amostra contendo as biomoléculas e o sal é passada ao longo da coluna de gel cujo limite de exclusão está abaixo do peso molecular das biomoléculas. As biomoléculas, as quais não entram no gel, emergem no volume

nulo da coluna, enquanto os sais entram na coluna e são retardados e com isso são removidos.

Vários autores utilizaram cromatografia de gel-filtração. COELHO et al. (1995), purificaram a enzima poligalacturonase em cromatografia de gel-filtração empacotada com o gel Sephadex G-100 (Pharmacia), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio pH 4,4. BORIN et al. (1996), purificaram e caracterizaram endo-PG de *Penicillium frequentans* em cromatografia de gel-filtração DEAE-Sephacel, onde foram coletadas 4 frações da enzima. SILVA (2003) separou enzimas pectinases em gel Sephadex G-50 e observou 3 picos diferentes para exo-PG e 4 picos diferentes para endo-PG e PL. PATHAK e SANWAL (1998) também separaram frações de PGs, sendo uma fração de endo-PG e as outras duas exo-PG.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Separar as frações de pectinases produzidas pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, através de cromatografia em gel sephadex;
- Caracterizar físico-quimicamente a solução enzimática bruta e as frações das enzimas separadas por cromatografia;
- Testar a especificidade das frações separadas em relação ao substrato.

### **3. MATERIAL e MÉTODOS**

#### **3.1. Microrganismo e substrato para cultivo**

O substrato utilizado, seu preparo e caracterização está descrito no item 3 do capítulo II. O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 como descrito no item 3.5 do capítulo II.

#### **3.2. FSS em embalagens de polipropileno, extração das enzimas e determinação das atividades enzimáticas**

O sistema de fermentação semi-sólida e a extração das enzimas foi realizado como descrito nos itens 3.9 e 3.10 do capítulo II. As atividades de pectinases foram avaliadas conforme descrito no item 3.11 do capítulo II.

#### **3.3. Caracterização físico química das pectinases do extrato enzimático bruto**

##### **3.3.1. Caracterização da exo-poligalacturonase e pectinialise**

##### **3.3.1a. Determinação do pH ótimo da enzima bruta**

Foram usados tampões acetato (pH 3,5 a 6,0), citrato-fosfato (pH 5,0 a 7,0), tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 8,0 a 10,5), contendo pectina a 1%. A mistura de reação constou de 0,5 mL de tampão e 0,5 mL de enzima, a qual foi incubada por 30 minutos a 40°C. Os produtos da reação da exo-poligalacturonase foram quantificados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1952) e os produtos liberados pela ação da pectinialise (uronídeos insaturados) foram quantificados pela leitura da absorbância a 235 nm, segundo o método de ALBERSHEIM (1966).

### **3.3.1b. Determinação da temperatura ótima da enzima bruta**

A mistura da reação contendo 0,5 mL de tampão determinado como ótimo para a atividade das enzimas (com 1% de pectina) e 0,5 mL da solução enzimática, foi incubada em temperaturas de 35 a 65°C. O açúcar redutor liberado pela ação da exo-poligalacturonase foi quantificado pelo método de SOMOGYI-NELSON (1952) e o produto da ação da pectinase, pelo método de ALBERSHEIM (1966).

### **3.3.2. Caracterização da atividade de endo- poligalacturonase**

#### **3.3.2a. Efeito do pH sobre atividade de endo-PG**

Foram testados os pHs 5, 6, 7, 8 e 8,5, seguindo-se o procedimento do item 3.3.1a

#### **3.3.2b. Efeito da temperatura sobre a atividade de endo-PG**

Foram testadas as temperatura de 35 a 65°C, com o mesmo procedimento descrito no item 3.3.1b.

### **3.3.3. Estabilidade frente à variações de pH da enzima bruta**

Foram utilizados 0,5 mL de tampão McIlvaine de pH 3,5 a 11, acrescentando-se 0,5 mL da enzima e mantendo a mistura a 25°C por 24 horas em temperatura determinada como ótima e após foi realizada a dosagem das pectinases.

### **3.3.4. Estabilidade frente à variações de temperatura da enzima bruta**

Foram incubados 2 mL da enzima em temperaturas de 7 a 65°C por uma hora em pH determinado como ótimo e após medindo-se a atividade residual.

### **3.4. Separação das frações enzimáticas**

A solução enzimática bruta foi obtida a partir da suspensão do material fermentado, após 6 dias de cultivo, em água destilada numa proporção de 20 mL/g de substrato fermentado. O extrato bruto resultante foi dialisado em contra tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,5 por 24 horas e dosadas as atividades da PG (endo e exo) e PL. Após, o extrato dialisado foi congelado em N<sub>2</sub> líquido e liofilizado até uma concentração de 10% do volume inicial e ressuspendido em 10 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,5. Um ml dessa amostra foi retirada para dosagem das atividades enzimáticas e 9 mL foram aplicados na coluna de separação cromatográfica gel Sephadex G-75, equilibrada e eluída com o mesmo tampão. As frações foram coletadas em volumes de 6 mL/ minuto (vazão de 0,4 mL/ min) por um período de 48 horas (990 mL). Foram realizadas dosagem de atividade enzimática e proteína (método de Bradford) nas frações coletadas.

### **3.5. Caracterização físico-química das frações enzimáticas**

As frações das enzimas endo e exo-PG obtidas pelo processo de separação cromatográfica foram caracterizadas físico-quimicamente como descrito nos itens 3.3.1; 3.3.2; 3.3.3 e 3.3.4.

Para os testes de especificidade das enzimas foram seguidos os mesmos procedimentos descritos no item 3.12 (capítulo II), variando-se os substratos, os quais constaram de: pectina de citrus de baixa esterificação (26%) e altamente esterificada (86%), ácido poligalacturônico, pectina de maçã obtidos da Sigma, além da pectina comercial (Braspectina) de alta metoxilação.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização físico-química das pectinases no extrato enzimático bruto

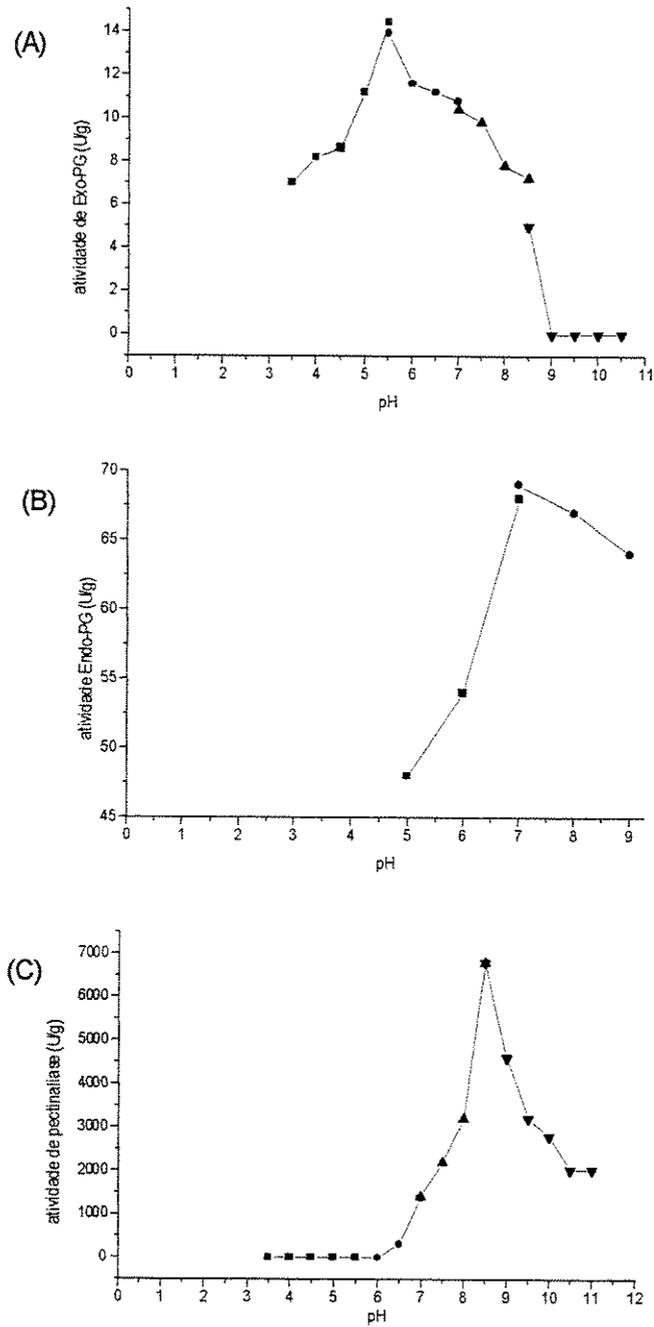
#### 4.1.1. Determinação do pH e temperatura ótima das enzimas exo e endo-PG e pectinaliase

Foram realizados ensaios para a obtenção das pectinases a serem caracterizadas como descrito no item 3.3. Foi utilizada solução enzimática bruta, obtida após 6 dias de fermentação, para determinação dos efeitos do pH e temperatura sobre a atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As Figuras 4.1.1.1A, 4.1.1.1B e 4.1.1.1C mostram as atividades medidas como função do pH do substrato. Como pode ser observado, o pH ótimo de atuação das enzimas foi 5,5 para exo-PG, 7,0 para endo-PG e 8,5 para pectinaliase.

A Figura 4.1.1.1A mostra o efeito do pH sobre a atividade de exo-PG, na qual observa-se maiores valores de atividade na faixa de pH entre 5,0 e 7,0. Em pH 3,5 e em pH 8,5, a enzima ainda manteve 52% de sua atividade, em relação aquela no pH ótimo (6,0). Nos pHs acima de 9,0 não foi detectada atividade enzimática.

As exo-PG de origem fúngica, geralmente apresentam pHs ótimos de atividade ácidos ou levemente ácidos. O mesmo valor de pH ótimo (5,5) encontrado para exo-PG de *P. italicum*, foi encontrado por YAO et al. (1996) para exo-PG de *P. expansum*. BORIN et al. (1996) e PIETRO e RONCERO (1996) encontraram pH ótimo de 4,0 para exo-PG produzidas por *P. frequentans* e *Fusarium oxysporum*. ZENGH e SHETTY (2000) encontraram pH ótimo de exo-PG produzida por *Lentinus edodes* de 5,0 e MARTINS (2003) pH ótimo 4,5 para exo-PG de *thermoascus aurantiacus*.



**Figura 4.1.1.1.** Efeito do pH sobre a atividade das (-■ - acetato; - ● - citrato-fosfato; - ▲ - tris-HCl; - ▼ - glicina -NaOH)

(A): Exo-PG

(B): Endo-PG

(C): pectinase

Pela Figura 4.1.1.1B observa-se maior atividade de endo-PG na faixa de pH entre 7,0 e 9,0, com pH ótimo em 7,0 nos dois tampões utilizados. O mesmo foi observado por SOARES (1999), quando pesquisou o pH ótimo de endo-PG de *Bacillus* sp e encontrou valores entre 6,5 e 7,0. Outros pesquisadores encontraram valores de pH ótimo para endo-PG entre 4,0 e 4,7 e observaram que em pHs maiores de 6,0 a enzima tornava-se inativa (BORIN et al., 1996).

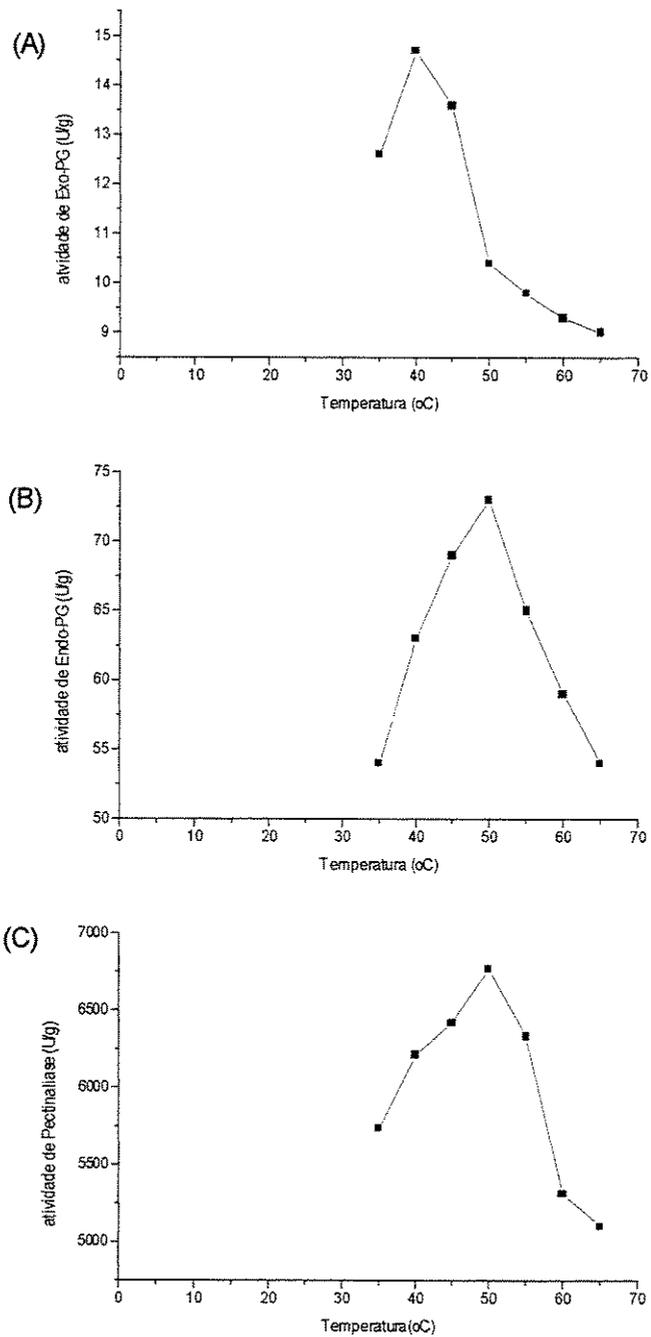
A Figura 4.1.1.1C mostra que a atividade de pectinálise foi maior na faixa entre 8,0 e 9,5, e que a atividade dessa enzima não foi detectada em pH ácido (3,5 a 6,0). Em pH alcalino (10,0), apresentou cerca de 61% da atividade observada em pH ótimo (8,5). Este dado é normalmente encontrado para outras PL fúngicas, segundo ACUÑA-ARGÜELES et al. (1995) que afirmam ficarem na faixa de 7,5- 8,5. MARTINS et al. (2002) observaram que a PL produzida por *Thermoascus aurantiacus* apresentou atividade na faixa entre 8,0 e 11,0, atingindo a atividade máxima em 10,5 - 11,0.

As Figuras 4.1.1.2A, 4.1.1.2B e 4.1.1.2C mostram a influência da temperatura na atividade enzimática de exo, endo-PG e pectinálise.

De acordo com a Figura 4.1.1.2A observa-se que a atividade da enzima exo-PG foi maior na faixa de temperatura entre 35 e 45°C. A 50°C apresentou 69% da atividade, em relação a temperatura ótima.

Através da Figura 4.1.1.2B, nota-se que a atividade de endo-PG foi máxima na faixa entre 40 e 55°C, porém, na temperatura de 60°C, apresentou 80% de sua atividade máxima.

Já para a pectinálise, a temperatura ótima para a sua atividade foi 50°C. A enzima ainda mostrou 75% da atividade a 65°C.



**Figura 4.1.1.2** Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas;

**(A):** Exo-PG

**(B):** Endo-PG

**(C):** pectinase

SOARES et al. (2000) observaram, temperatura ótima de 50°C e 55°C para PG produzidos pelos fungos *P. pinophilum* e *Peniophora cinerea*, respectivamente. MARTINS (2003) encontrou valores de temperatura ótima de 65°C para exo-PG e PL de *Thermoascus aurantiacus*. BORIN et al. (1996) encontraram, para endo-PG de *P. frequentans*, temperatura ótima de 50°C. ZHENG e SHETTY (2000) observaram atividade ótima de exo-PG, na temperatura de 50°C e pH 5,0, em FSS, utilizando como substrato resíduos agroindustriais e o fungo *Lentinus edodes*.

#### **4.1.2. Determinação da estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura**

Após a determinação do pH e temperatura ótimos de atividade de exo, endo-PG e pectinaliase, foram feitos testes para determinar-se a estabilidade frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato. As Figuras 4.1.2.1A., 4.1.2.1B e 4.1.2.1C, mostram a estabilidade das enzimas em relação ao pH.

Pode-se observar pela Figura 4.1.2.1A que a exo-PG mostrou-se estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,0, apresentando 100% de sua atividade original no pH 6,0. A enzima, preservou mais de 60% de sua atividade máxima em pH 4,5 e 8,5. Em pH abaixo de 4,5, mostrou ser menos estável, com apenas 30% da atividade comparada com a atividade inicial.

Com relação a enzima endo-PG (Figura 4.1.2.1B), pode-se observar que a mesma mostrou-se estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,5, apresentando 100% de sua atividade original em pH 6,0. Em pH 3,5 e 9,0 preservou mais de 50% de sua atividade original.

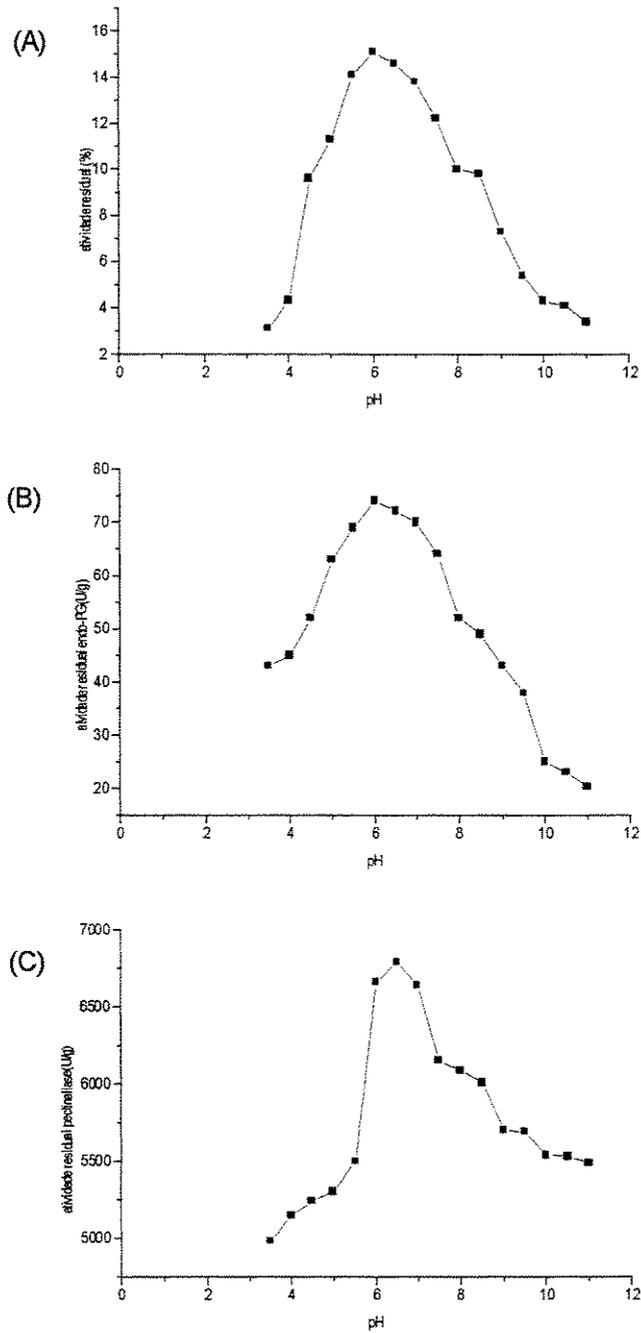


Figura 4.1.2.1 Estabilidade das enzimas frente à variações de pH:

**A:** estabilidade de Exo-PG (100% - 15,1 U/g)

**B:** estabilidade de endo-PG (100% 74 U/g)

**C:** estabilidade de pectinase (100% - 6790 U/g)

Já para a enzima pectinaliase, observou-se estabilidade na faixa de pH entre 6,0 e 7,0, com 100% de sua atividade original em pH 6,5. Em pH 3,5, mostrou mais de 70% de sua atividade original e, na faixa de 7,5 e 11,0 preservou mais de 80% dessa atividade.

MARTINS (2003) estudou a estabilidade de exo-PG e PL de *Thermoascus aurantiacus* em função do pH do meio. Para atividade de exo-PG, observou estabilidade na faixa de 7,5 a 8,0, com 100% de sua atividade original e em pH 11,5, 60%. Nos valores entre 5,5 e 7,0, houve queda na atividade enzimática. Para enzima PL, observou estabilidade nos pHs entre 3,0- 4,0 e houve 55% preservação de 55% de sua atividade original em pH 11,0.

Na literatura são reportados alguns resultados próximos aos encontrados neste trabalho: pH ótimo de atividade entre 3,5 e 5,0 para endo-PG de *P. frequentans* (BORIN et al., 1996); pH entre 4,5 e 6,0 para exo e endo-PG de *A. niger* (ACUNA-ARGUELLES et al., 1995); pH 8,0 para pectinaliase de *P. italicum* CECT 22941 (ALANA et al., 1990); pH entre 3,8 e 6,5 para endo-PG de *Rhizopus arrhizus* e pH 5,2 para PL de *A. fonsecaeus* (GUMMADI e PANDA, 2003).

As Figuras 4.1.2.2A, 4.1.2.2B e 4.1.2.2C mostram a estabilidade das pectinases em função da temperatura.

Observa-se pela Figura 4.1.2.2A que a enzima exo-PG manteve 100% da sua atividade original após 1 hora, a 45°C, embora tenha apresentado estabilidade na faixa de temperatura entre 7 e 50°C, preservando 95% da sua atividade original. Em temperatura acima de 50°C, houve perda de 40% da estabilidade.

Para pectinaliase (Figura 4.1.2.2B), observou-se 100% de estabilidade na faixa de temperatura entre 7 e 45°C. Na temperatura de 50°C, apresentou mais de

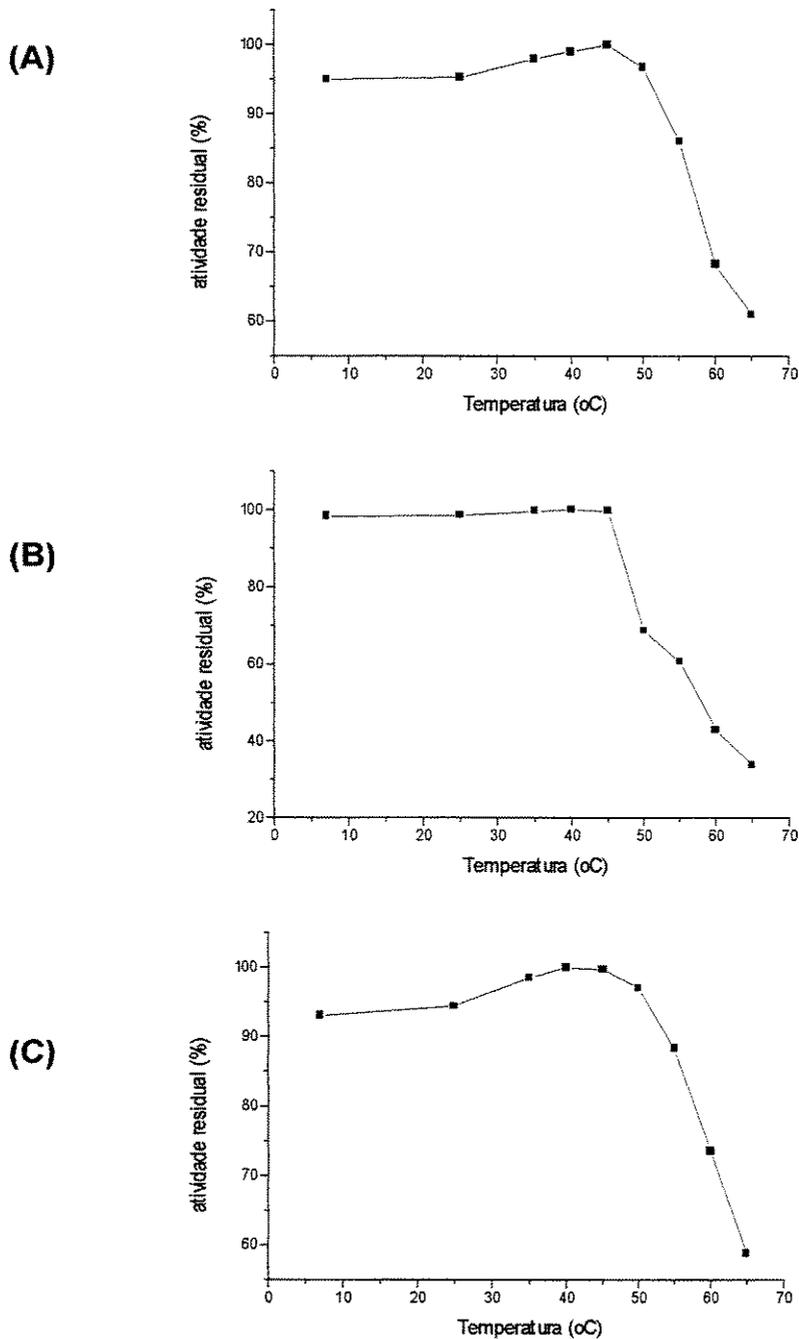
60% de estabilidade frente a sua atividade original e na temperatura de 65°C, 30%.

A endo-PG (Figura 4.1.2.2C), apresentou 100% de estabilidade da sua atividade original, na faixa de temperatura entre 40 e 45°C. Apresentou estabilidade maior de 90%, em relação à sua atividade original, na faixa de temperatura entre 7 e 35°C e na temperatura de 60°C, apresentou mais de 70% e em 65°C, abaixo de 60%.

Foram encontradas na literatura, temperaturas ótimas de 50°C para atividade de endo-PG e pectinaliase de *P. frequentans* e *P italicum* CECT 22941, respectivamente (BORIN et al., 1996; ALAÑA et al., 1990). ZHENG e SHETTY (2000) observaram que a enzima exo-PG produzida por *Lentinus edodes* mostrou-se estável até 50°C e, a 60°C, manteve cerca de 40% da atividade original.

Foi estudado por MARTINS (2003) a estabilidade das enzimas exo-PG e PL frente à temperaturas, e este observou que a enzima exo-PG manteve 100% da sua atividade original, após ser mantida por 1 hora até a temperatura de 50°C e 80%, a 60°C. A PL, manteve 100% da sua atividade original até 60°C e 91% na temperatura de 70°C. A 80°C, observou-se manutenção de 22%.

A interação do efeito entre pH e temperatura é um aspecto interessante que pode mudar a estabilidade da enzima. Foi realizado um estudo visando a avaliação dos efeitos da combinação entre diferentes valores de pH e temperatura na estabilidade de polimetilgalacturonase, PG e PL de *A. niger*. O pH e temperatura ótimos para atividade de PMG foram 2,23 e 23°C, respectivamente. Para PG, o pH foi 4,8 e temperatura 28°C e para PL, 3,9 e 29°C, respectivamente (GUMMADI e PANDA, 2003).



**Figura 4.1.2.2.** Estabilidade das atividades enzimáticas frente às variações da temperatura:

**A:** estabilidade de Exo-PG (100% - 15,01 U/g)

**B:** estabilidade de endo-PG (100% - 74,2 U/g)

**C:** estabilidade de pectinaliase (100% - 6800 U/g)

O estudo das características físico-químicas das enzimas é de suma importância, pois cada enzima possui características próprias, as quais determinam sua aplicação em determinados produtos e processos.

As enzimas pectinases com características ácidas são utilizadas em indústrias processadoras de sucos, na preparação do suco comercial, na extração de sucos (laranja, uva, maçã, pêra, etc), participando da clarificação e levando à redução da viscosidade de sucos concentrados (KASHYAP et al., 2001).

As enzimas com características alcalinas são utilizadas no tratamento e degomagem de fibras brutas vegetais (rami, juta, cânhamo, linho, etc.), na extração de óleos (canola, palmeira, oliva, etc), na fermentação de chá e café, etc. (KASHYAP et al., 2001).

As enzimas estudadas aqui, possuem características ácida e alcalina, indicando que as mesmas podem ser utilizadas em vários processos como citado acima. A exo-PG possui estabilidade acima de 60%, em pH entre 4,5 e 8,5, a endo-PG possui entre 4,0 e 8,5 e a pectinálise entre 3,5 e 11,0, mostrando ser a mais estável em ampla faixa de pH. Esta ampla faixa de pH, permite o uso destas enzimas na produção de diferentes tipos de sucos (ácidos a neutros), onde por despolimerização quebram a pectina em suspensão, aumentando a quantidade de suco livre. Atuam também, no processo de clarificação e maceração de vegetais.

Quanto à temperatura, a exo-PG apresentou estabilidade acima de 60% na faixa entre 7 e 65°C, a endo-PG acima de 50% na faixa entre 7 e 55°C e a pectinálise acima de 60%, entre 7 e 65°C. Com esses dados, pode-se concluir que essas enzimas possuem características desejáveis para serem utilizadas em processos industriais que requerem temperaturas de até 65°C. Para evitar contaminação de sucos por leveduras, durante o processo de clarificação, evita-se as temperaturas entre 15 e 54°C. O mesmo, deve ocorrer à temperatura de 15°C por 12 horas ou a 54°C por 1-2 horas. Segundo LEA (1998) o ideal para os

processos de clarificação enzimática, seria o uso de temperaturas superiores à 54°C, pois acima desse valor, os sucos já estariam recebendo tratamento térmico (processo de pasteurização), além de reduzirem a viscosidade. Segundo esta mesma autora, altas temperaturas limitam o uso das enzimas, pois não é comum encontrar pectinases com boa estabilidade em temperaturas superiores à 50°C, o que foi confirmado neste trabalho.

## 4.2. Separação das Enzimas

Foi realizado um ensaio de fermentação semi-sólida, para obtenção da solução enzimática bruta a ser utilizada nos ensaios cromatográficos em gel Sephadex G-75.

Na Tabela 4.2.1 é mostrada a síntese do processo de separação das frações enzimáticas. Observa-se que a atividade da enzima bruta para exo-PG foi de 13,2 U/mL e para endo-PG, 36,9 U/mL. Após a diálise, ocorreu aumento da atividade enzimática de 13,5% para exo-PG e 8,2% para endo-PG. SILVA (2003) também observou aumento da atividade enzimática após processo de diálise das enzimas exo e endo-PG de *P. viridicatum*. Segundo este mesmo autor, isto possivelmente ocorreu, devido a presença de íons e/ou substâncias inibidoras de enzima os quais foram retirados no processo de diálise.

Durante o processo de liofilização observou-se uma redução de 24,5% na atividade de exo-PG e de 20,4% na de endo-PG. Essa redução pode ser considerada insignificante comparada com os dados de SILVA et al. (2002) os quais mostram reduções de 69% para exo-PG e 48% para endo-PG.

**Tabela 4.2.1.** Síntese do processo de separação das enzimas exo e endo-PG em coluna Sephadex G-75 a partir da solução enzimática bruta obtida após sexto dia de cultivo em fermentador de coluna, em meio semi-sólido de bagaço de laranja industrializado.

		Vol. (mL)	U/mL	U/total	Proteína U/mL	Proteína total (U/mL)	Atividade específica	Rendimento %
Enzima bruta	Exo-PG	200	13.2	2640	25.9	5180	0.51	100
	Endo-PG		36.9	7380			1.42	100
Díálise	Exo-PG	150	15.25	2287.5	28.2	4230	0.54	86,65
	Endo-PG		40.2	6030			1.42	81,71
Liofilizada	Exo-PG	100	11.5	1150	23.4	2340	0.49	43,6
	Endo-PG		32.0	3200			1.37	43,4
Aplicados em Sephadex G-75	Exo-PG	10	49,5	495	127,2	25164	0,39	18,75
	Endo-PG		196,5	1965			1,55	26,6

\* Não foi determinada atividade de PL, pois esta não foi detectada no extrato enzimático bruto

As Figuras 4.2.1A e 4.2.1B mostram a separação das frações enzimáticas de endo e exo-PG em gel Sephadex G-75. As frações foram coletadas em volumes de 6 mL a cada 15 min (fluxo de 0,4 mL/min.) por um período de 48 horas. Foram observados 2 picos para enzima exo-PG e um pico para endo-PG. Após a separação das enzimas, foram dosadas atividades das frações coletadas, onde a atividade total da exo-PG foi de 49,5 U/mL e 196,5 U/mL para endo-PG. Não foram detectadas frações de pectinálise e estas também não foram detectadas na solução enzimática bruta.

A separação de frações exo-PG a partir do meio de cultura de *Aspergillus niger* 3T5B, utilizando gel filtração cromatográfica Sephadex G-100, levou a obtenção de apenas um pico da fração da enzima em questão, conforme demonstrado por COELHO et al. (1995).

SILVA (2002) estudou o processo de separação das enzimas exo, endo-PG e PL de *Penicillium veritcatum* RFC3 produzidas em embalagens de polipropileno

utilizando como substrato farelo de trigo e bagaço de laranja industrializado. No processo de separação obteve três picos diferentes para Exo-PG e quatro picos de endo-PG e PL, utilizando filtração em gel Sephadex G-50.

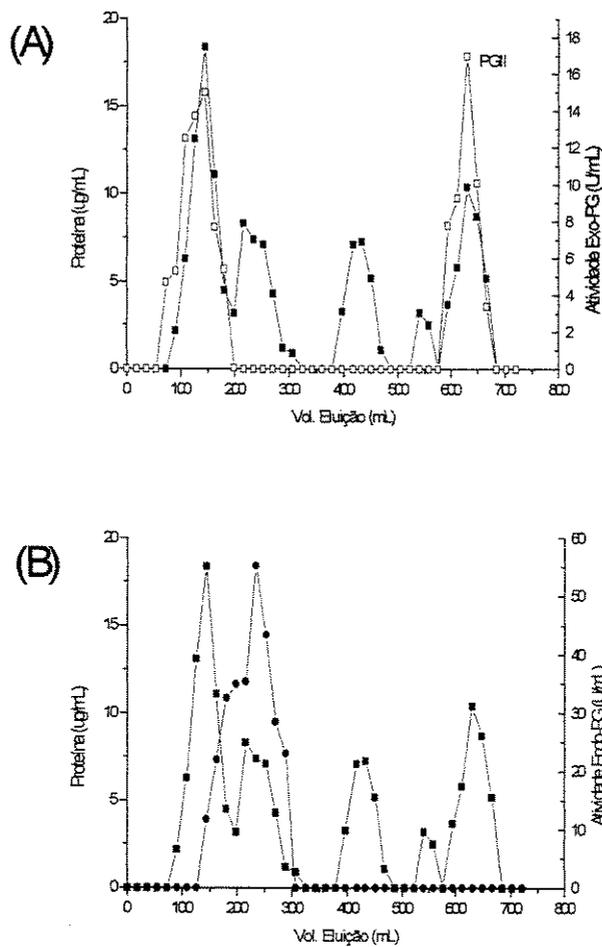


Figura 4.2.1. Separação das frações enzimáticas em coluna gel

(A): atividade de Exo-PG (- □ -)

(B): atividade de Endo-PG (- ● -)

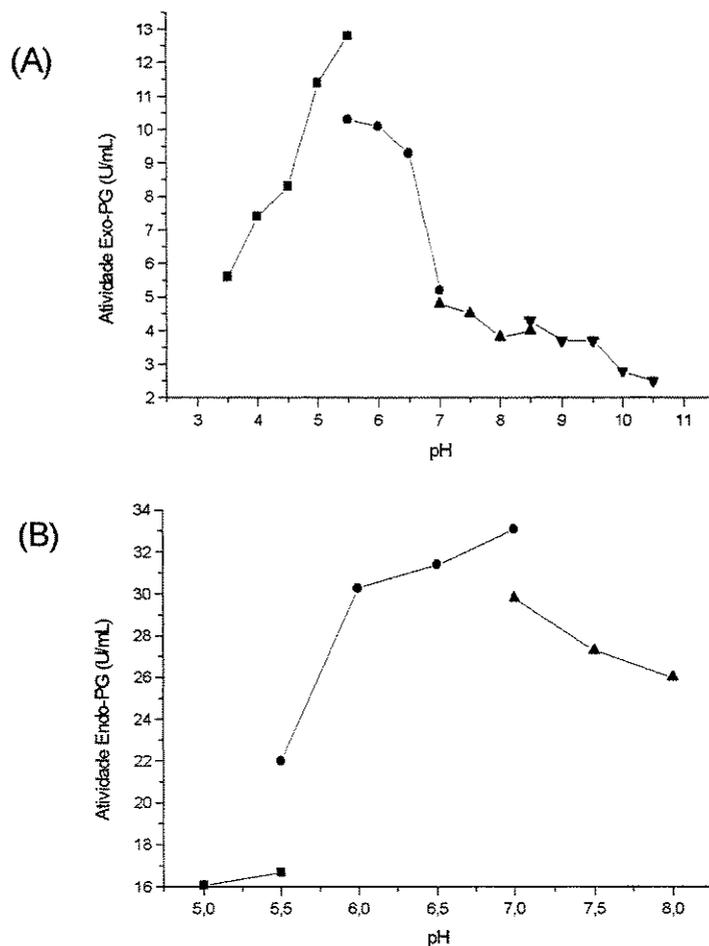
### **4.3. Caracterização Físico-química das frações coletadas**

As frações de exo e endo-PG coletadas durante a separação foram caracterizadas físico-quimicamente.

As Figuras 4.3.1A e 4.3.1B mostram as atividades enzimáticas em função do pH da mistura de reação. Pode-se observar pelas figuras, pH ótimo (máximo) de atuação 5,5 (tampão citrato-fosfato) para exo-PG e 7,0 (tampão citrato-fosfato) para endo-PG. Pode-se observar ainda, que a atividade enzimática foi maior na faixa de pH 5,0 e 6,5 com decréscimo até pH 10,5.

Nestas figuras, observa-se que a atividade de exo-PG foi maior na faixa de pH entre 5,0 e 6,5 e decresceu cerca de 62% em pH 6,5 comparado com a atividade máxima que ocorreu em pH 5,5 e continuou decrescendo até pH 10,5. Para endo-PG, a atividade enzimática foi maior na faixa de pH 6,0 e 7,0 e atividade ótima em pH 7,0 e após esse pH decresceu apenas 20% até pH 8,0. Na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 o decréscimo foi maior, cerca de 50%.

Comparando esses valores com o extrato enzimático bruto (Figuras 4.1.2.1A e B), pode-se observar, que a atividade de exo e endo-PG, sofreram alterações nas faixas de pH. A atividade de exo-PG apresentou pequena alteração, com maior atividade, na faixa de pH 5,0 e 7,0. Para endo-PG, a atividade ocorreu em uma faixa maior de pH 7,0 a 9,0.



**Figura 4.3.1.** Efeito do pH sobre a atividade das enzimas (-■ - acetato; -● - citrato-fosfato; -▲ - tris-HCl; -▼ - glicina -NaOH)

**(A):** Exo-PG

**(B):** Endo-PG

As Figuras 4.3.2A e 4.3.2B mostram a influência da temperatura na atividade enzimática de exo e endo-PG. A enzima exo-PG teve boa atividade na faixa de temperatura de 7 a 55°C e temperatura ótima de 40°C. Após temperatura de 55°C, a atividade enzimática sofreu decréscimo de 34,3%. A endo-PG, apresentou boa atividade na faixa de 45 a 55°C, com temperatura ótima de 55°C. A atividade decresceu cerca de 22% a de 60°C e 34,4%, para 65°C. Em comparação ao extrato enzimático bruto (Figuras 4.1.1.2A e B), a temperatura

ótima para exo-PG foi a mesma (40°C), enquanto para endo-PG no extrato bruto foi 50°C e purificada 55°C.

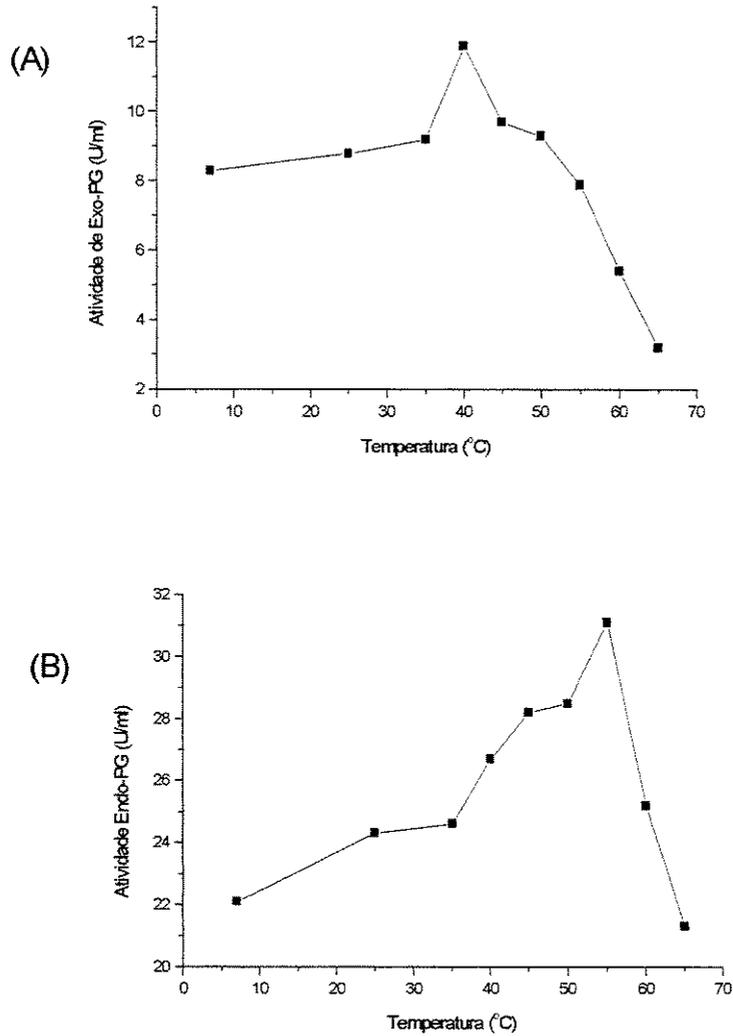


Figura 4.3.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzimas

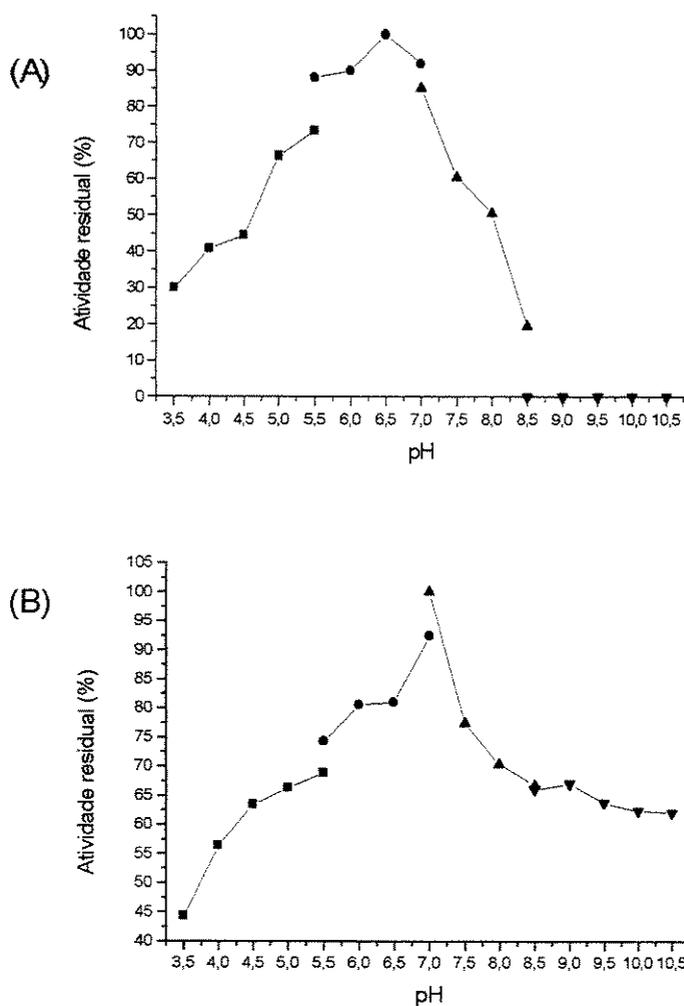
(A): Exo-PG

(B): Endo-PG

Na literatura, são encontrados vários trabalhos de autores que estudaram as características de frações de pectinases, obtendo temperaturas de 50 e 55°C para frações de exo e endo-PG, respectivamente, de *Aspergillus carbonarius* (DEVI e RAO,1996); temperatura de 50°C para endo-PG de *Penicillium frequentans* (BORIN et. al.,1996); 60°C para exo- PG de *Bacillus sp.* (KAPOOR et al., 2000); 50°C para endo-PG e PL e 40-60°C para exo-PG de *Penicillium veritcatum* (SILVA, 2002).

As Figuras 4.3.3A e 4.3.3B, mostram a estabilidade das enzimas em relação ao pH. Para exo-PG, pôde-se observar que a atividade enzimática foi estável na faixa de pH 5,0-8,0. Em pHs abaixo e acima desta faixa, foi preservado menos de 50% de sua atividade máxima, observada em pH 6,5. Para endo-PG, a atividade enzimática mostrou-se estável na faixa de pH de 5,5- 7,5, com máxima estabilidade em pH 7,0. Em pH abaixo e acima dessa faixa, ainda apresentou mais de 50% de estabilidade comparada com a original. Apenas em pH 3,5 apresentou baixa estabilidade, preservando apenas cerca de 43% da atividade original.

SILVA (2003) observou ótima estabilidade de exo-PG de *P. viritcatum* obtida em FSS a pH 8,0, e que esta enzima, ainda manteve 90% de estabilidade comparada com a original na faixa de pH 5,0 a 8,0.



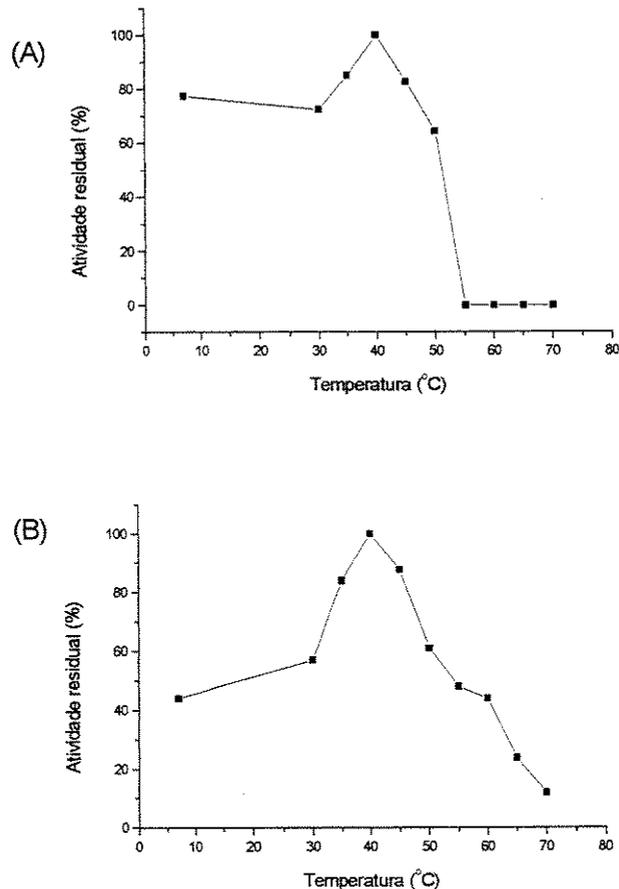
**Figura 4.3.3.** Estabilidade das enzima frente à variações de pH (-■ - acetato; - ● - citrato-fosfato; - ▲ - tris-HCl; - ▼ - glicina -NaOH)

**(A):** Exo-PG (100% - 10,3 U/ml).

**(B):** Endo-PG (100% - 27,3 U/ml)

As Figuras 4.3.4A e 4.3.4B mostram a estabilidade exo e endo-PG frente à variações de temperatura. Nota-se que as enzimas exo e endo-PG mostraram-se estáveis após uma hora a temperatura de 40°C. A exo-PG apresentou estabilidade acima de 50% na faixa de temperatura de 7-50°C, comparada com a atividade original. Em temperatura de 55°C, a enzima não apresentou atividade. A endo-PG

apresentou estabilidade na faixa de 35 a 45°C, com ótima na temperatura de 40°C. A enzima manteve-se com mais de 50% de atividade na faixa de 35 a 50°C e após 50°C, com decréscimo acentuado em temperatura acima de 50°C.



**Figura 4.3.4.** Estabilidade das enzimas frente às variações da temperatura

**(A):** Exo-PG (100% - 9,8 U/mL)

**(B):** Endo-PG (100% - 25,2 U/mL)

Pode-se observar, que as enzimas em estudo, no extrato enzimático bruto ou fracionadas, sofreram pequenas alterações na atividade enzimática, em relação ao pH e temperatura. Isto pode ter ocorrido, por hipótese, devido a influência de substâncias presentes no extrato enzimático bruto. A estabilidade das enzimas frente ao pH e temperatura, foram similares no extrato enzimático bruto e no fracionado.

#### 4.4. Especificidade pelo substrato

As frações enzimáticas foram testadas quanto à especificidade por diferentes substratos com graus diferentes de metoxilação: ácido poligalacturônico, pectina de citrus de alta (92%) e de baixa (26%) metoxilação e pectina de maçã, obtidas da Sigma, além da pectina comercial obtida pela Braspectina.

Os resultados obtidos (Figura 4.4.1) demonstram que a exo-PG quebra preferencialmente a pectina comercial de alta esterificação 73% (Braspectina), seguida pela pectina de alta esterificação 92%, de maçã, ácido poligalacturônico e por último a de baixa metoxilação 26%. A endo-PG apresentou maior especificidade pela pectina de maçã, pectina comercial de alta metoxilação 73% (Braspectina), pectina de alta metoxilação 92%, ácido poligalacturônico e por último a pectina de baixa metoxilação 26%.

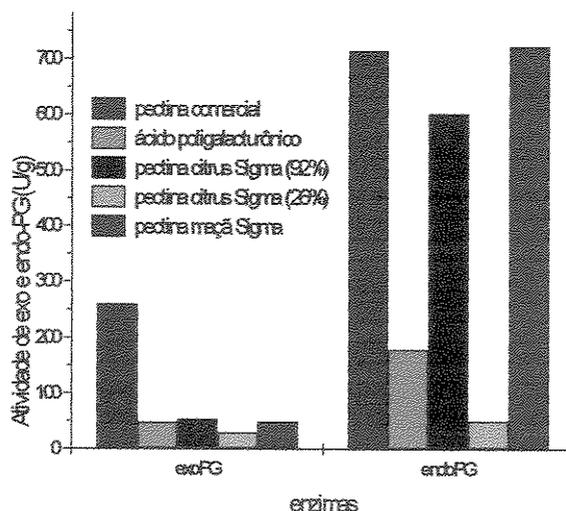


Figura 4.4.1. Ação das pectinases sobre pectinas de diferentes graus de metoxilação

Pode-se observar (Figura 4.4.1) que as enzimas exo e endo-PG tiveram uma maior afinidade pela pectina comercial Braspectina. Esse fato pode ser

explicado pela impureza da pectina comercial, onde esta pode apresentar outros polissacarídeos como substrato, acarretando em um aumento da atividade.

Quanto aos outros substratos em questão, pode-se observar que as enzimas hidrolizaram os substratos de alta metoxilação. Esta característica é confirmada por PILNIK e VORAGEN (1993), onde segundo esses autores as pectinas de alta metoxilação são os substratos preferidos das PGs por apresentarem alta atividade enzimática na presença destas. Entretanto, segundo ROMBOUTS e PILNIK (1978) a atividade de endo-PG diminui com o aumento do grau de metoxilação do substrato. WHITAKER (1990) também observou que a fração endo-PG não possui atividade em substrato altamente metoxilado.

Outros autores sugerem que o grau de metoxilação da cadeia de pectina age como inibidor causando diminuição na atividade de PG (REXOVA-BENKOVA et al., 1977).

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 despolimerase e subdivididas conforme a especificidade quanto ao substrato preferencial (pectina, ácido péctico ou oligalacturonato). Podem ser classificadas em polimetilgalacturonase (PMG), poligalacturonase (PG), polimetilgalacturonato liase (PMGL), poligalacturonato liase (PGL) (WHITAKER, 1990).

SILVA (2003) observou que as enzimas pectinases produzidas por *P. virificatum* atuavam preferencialmente em cadeias esterificadas o que sugeriu ser uma enzima polimetilgalacturonase e não uma poligalacturonase. Os dados obtidos neste trabalho indicam que as enzimas atuaram em pectinas altamente esterificadas o que sugere ser uma polimetilgalacturonase.

## **5. CONCLUSÕES**

- Na caracterização físico-química do extrato enzimático bruto, as pectinases exo e endo-PG e pectinaliase possuem pH ótimo de 5.5, 7.0 e 8.5, respectivamente, e temperatura ótima de 40°C para exo-PG e 50°C para endo-PG e pectinaliase;
- O processo de separação das enzimas exo e endo-PG em coluna Sephadex G-75, mostrou-se efetivo, com bons valores de rendimento quando comparados com os valores do extrato enzimático bruto (87% para exo e 86,7% para endo-PG);
- Na especificidade pelo substrato, pode-se observar a enzima em estudo é uma polimetilgalacturonase.

## **CAPÍTULO VI**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA SOLUÇÃO  
ENZIMÁTICA BRUTA NO PROCESSAMENTO DE SUCOS:  
APLICAÇÃO DE PECTINASES NA EXTRAÇÃO DE SUCOS DE  
FRUTAS E VEGETAIS E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE  
MICOTOXINAS NO MATERIAL FERMENTADO**

## 1. INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido pectínico e pectina de acordo com a cadeia. As protopectinas são substâncias pécticas insolúveis em água e encontradas nos tecidos de plantas em frutas verdes; os ácidos pécticos são galacturanas que contém quantidades desprezíveis de grupamentos metoxila enquanto que os ácidos pectínicos são galacturanas que formam pectinatos que geralmente são sais ácidos ou ácidos pectínicos que possuem a propriedade de formar gel com açúcar e ácido; e a pectina é um nome genérico para uma mistura variada de componentes cujo ácido péctico é o maior deles (BE MILLER, 2001; KILARA, 1982; KASHYAP et al. 2001).

O termo “enzimas pectinolíticas” ou pectinases, designa as enzimas capazes de degradar os poliuronídeos das moléculas das substâncias pécticas. A classificação das enzimas pectinolíticas é feita de acordo com a sua atuação sobre essas substâncias, dividindo-se em dois grupos principais: esterase e despolimerase e subdivididas conforme a especificidade quanto ao substrato preferencial (pectina, ácido péctico ou oligogalacturonato) e segundo o padrão de ação (endo-enzimas e exo-enzimas). Podem ser classificadas em polimetilgalacturonase (PMG), poligalacturonase (PG), polimetilgalacturonato liase (PMGL), poligalacturonato liase (PGL) (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; WHITAKER, 1990; KASHYAP et al., 2001).

As enzimas pectinases são muito utilizadas nas indústrias de alimentos e principalmente nas indústrias processadoras de sucos e agem de formas diferentes nos sucos de frutas e vegetais. Em sucos límpidos e brilhantes (maçã, pêra e uva), essas enzimas aumentam o rendimento do suco extraído durante a prensagem e facilitam a filtração por promoverem a remoção do material em suspensão. Em sucos com turbidez (laranja, ameixa, tomate e néctar), a poligalacturonases degrada rapidamente o ácido péctico formado, evitando, dessa

forma, precipitação e originando uma opacidade estável (WHITAKER, 1984; BRAVO et al., 2000; KASHYAP et al., 2001).

Dentre as frutas de clima temperado, a maçã é considerada a mais importante, a mais popular e a que tem melhor distribuição, sendo encontrada durante o ano todo nos mais distantes povoados brasileiros. A produção dessa fruta, atualmente, ultrapassa as 600.000t métricas/ano e o Brasil já é auto-suficiente com relação ao produto. Como acontece com as grandes produções agrícolas, existe sempre um excedente de safra, que não é comercializado no mercado "in natura" e a maçã não foge a regra. Tal excedente pode chegar a 20% mais ou menos da produção, constituindo-se, assim, em uma fonte para extração de suco (TOCCHINI et al., 1995).

Existem dois tipos de suco de maçã: o turvo e o clarificado e ambos podem ser simples ou concentrados. O suco clarificado é um produto bastante popular em diversos países e o processo de clarificação é feito basicamente, por meio da aplicação de enzimas pectinolíticas, que aceleram a despectinação e liquefazem o amido do suco. Estas podem ser aplicadas diretamente sobre a polpa extraída ou mesmo sobre o suco turvo. O resultado, após as etapas seguintes do processo (centrifugação, filtração, etc.) é um suco claro, estável e brilhante (TOCCHINI et al., 1995).

A banana é a segunda fruta mais produzida no mundo. Segundo dados da FAO, órgão das Nações Unidas para agricultura e alimentação, a banana foi cultivada em 124 países e ocupou em 2002 uma área de 4,2 milhões de hectares, com uma produção de 69,5 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro maior produtor com 6,3 milhões de toneladas produzidas em 508 mil hectares (Agência Brasil - Abr, 2003).

A banana é uma fruta muito apreciada pelo seu flavor e propriedades nutricionais. O suco de banana é muito apreciado e o suco clarificado vem sendo

alvo de estudo por muitos pesquisadores (VIQUEZ et al., 1981; YU & WU, 1987; PHEENTAVEERAT & ANPRUNG, 1993; CARDOSO et al., 1998; GOMES et al., 2001; SILVA, 2003).

A cenoura é uma das hortaliças mais tradicionais consumidas no Brasil. Em decorrência do seu conteúdo em carotenóides totais, substâncias com propriedades antioxidantes e com ação inibidora/preventiva contra algumas doenças, a cenoura pode ser considerada como um dos alimentos do próximo milênio. Sua produção gira em torno de 30-35 toneladas de raízes comerciais por hectare nas principais regiões produtoras. O suco da cenoura é muito utilizado em conjunto com sucos de frutas e como complemento em outros produtos como iogurte.

As soluções enzimáticas aplicadas na indústria de alimentos geralmente constituem "preparados enzimáticos" com purificação apenas parcial. Assim, podem conter toxinas produzidas durante a fermentação para a obtenção das enzimas. As micotoxinas são substâncias altamente tóxicas e carcinogênicas que se ingeridas em altas doses, podem causar intoxicações de evolução rápida com comprometimento de vários órgãos e quando ingeridas com doses mais baixas e freqüentes, causam indução de câncer, principalmente no fígado, e a diminuição da resistência de animais às doenças. Nesses últimos anos há uma intensa investigação no sentido de as detectar e prevenir.

Alguns fungos são capazes de produzir e liberar toxinas em produtos agrícolas, no campo, no armazenamento, durante o transporte, na fase de industrialização e em qualquer momento de fase de consumo. As principais espécies de fungos toxigênicos, isto é com capacidade de produzir micotoxinas, são dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Segundo TANIWAKI e SILVA (1996), a produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto, pode ocorrer em qualquer época do cultivo,

colheita ou estocagem dos alimentos. Contudo, nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo depois que os fungos responsáveis tenham morrido. Os gêneros de fungos mais comumente associados com toxinas que ocorrem naturalmente são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

É difícil ter uma visão extensa da magnitude da contaminação de alimentos por micotoxinas, porque somente alguns tipos de micotoxinas têm sido implicados em surtos de micotoxicoses. No caso das demais, existem apenas evidências circunstanciais que ligam algumas delas com micotoxicoses em particular, restando um número significativo que é conhecido apenas a partir da produção em culturas de laboratório (COKER et al., 1984).

Espécies de fungos filamentosos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários como Brevianamidinas A e B (cuja função é desconhecida), óleos, como Xantoviridicatina, pigmentos como Viomelina, Xantomegnina, Rubrosulfina e Vioxantina (POHLAND, 1977) e micotoxinas, como ocratoxinas, aflatoxinas, patulinas, e outras, podem ser associados a uma grande variedade de efeitos adversos em animais e humanos. Esses compostos ocorrem no micélio desses microrganismos ou podem estar presentes nos esporos (D'MELLO e MACDONALD, 1997).

A produção destas toxinas durante o crescimento de fungos está relacionada com o tempo, temperatura, umidade e extensão da infecção (SCOTT, 1989). A infestação de *F. moniliforme* em cultivares de milho e a produção de Aflatoxina B1 estão relacionadas com a atividade de água, temperatura, relação O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, etc (D'MELLO et al., 1997 e RAMOS et al., 1998) assim como, com a capacidade do fungo em produzir toxina (FARRAR e DAVIS, 1991). ABRAMSON et al. (1999), mostraram a produção de micotoxinas por espécies como *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor* e *Penicillium sp.* em cevada, armazenadas em celeiros a 15 e 19% de umidade, correlacionando ainda esta produção a uma série de fatores

como temperatura, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, presença de invertebrados, quantidade de inóculo, germinação das sementes. As micotoxinas detectadas foram a ocratoxina A, citrinina e esterigmatocistina. A produção destas micotoxinas por *Penicillium sp* foi maior a 19% de umidade não sendo produzida a 15%.

A produção de toxinas também é afetada por fatores químicos, como aditivos químicos (sorbato de potássio, metil parabeno, propionato de sódio e bissulfito de sódio). Conforme descrito por TONG e DRAUGHON (1985), que estudaram os efeitos desses aditivos alimentares na inibição da produção da OTA por linhagens de *P. viridicatum* e *A. sulphureous*, o sorbato de potássio (0,134%) e o metil parabeno (0,067%) em pH 4,5 e 5,5, inibiram a produção de toxina, porém, os níveis utilizados excedem o permitido para o consumo humano. Plantas medicinais da Índia, espécies de canela, rosa, açafrão, curcuma parecem inibir a produção de toxinas (AZIZ et al., 1998).

Segundo TANIWAKI e SILVA (1996) as principais dificuldades que têm impedido um conhecimento mais extensivo da ocorrência de micotoxinas em diferentes substratos de crescimento fúngico, relacionam-se com os seguintes fatos:

- as toxinas ocorrem em concentrações muito baixas, o que dificulta a detecção, além de não se dispor de métodos de detecção para a maioria delas;
- De modo geral, quando os sintomas de micotoxicose começam evidenciar-se, os alimentos ou rações suspeitos já foram descartados;
- Os sintomas geralmente não são específicos, como a redução no ganho de peso e a menor eficiência na conversão do alimento, por exemplo;
- Os médicos e veterinários não são treinados ou familiarizados com os sintomas de micotoxicoses;
- Finalmente, para agravar a confusão em torno do assunto, tem-se observado que algumas toxinas fúngicas nunca foram implicadas em qualquer

micotoxiose, ao mesmo tempo, algumas doenças são suspeitas de ser de origem micotóxica, porém, nenhuma toxina foi encontrada.

Micotoxinas produzidas pelas espécie de *Penicillium* ( TANIWAKI e SILVA, 1996):

- ácido penicílico: *P. aurantiogriseum*
- ácido ciclopiazônico: *P. griseofulvum*, *P. commune*, *P. camembertii*
- citreoviridina: *P. citreonigrum*
- citrinina: *P. citrinum*, *P. expansum*
- ocratoxina: *P. verrucosum*, *P. veridicatum*
- patulina: *P. expansum*, *P. griseofulvum*
- penitrem A: *P. crustosum*
- roquefortina C: *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *P. oxalicum*, *P. roqueforti*

De acordo com as reações farmacológicas, as micotoxinas podem ser classificadas nas seguintes categorias:

<b>categorias</b>	<b>Micotoxinas</b>
carcinogênicas	aflatoxinas, luteosquirina, etc
mutagênicas	aflatoxinas, 8 metoxipsoralen
hepatotóxicas	Aflatoxinas, ocratoxina A, rubratoxina
nefrotóxicas:	ocratoxina A, citrinina
estrogênica:	Zearalenona
neurotóxicas	patulina, fuminisinas

Em 1993 a WHO - International Agency for Research on Cancer avaliou o potencial carcinogênico de Aflatoxinas (AF), Ocratoxinas (OT), Tricotecenos, Zealeronas (ZEN), Fumorzinas (F). As AF são classificadas como carcinogênicas em humanos (grupo 1) enquanto que as OT e F são classificadas como possíveis carcinogênicos (grupo 2). Já os Tricotecenos e ZEN não são classificados como carcinogênicos em humanos (WHO-IARC, 1993a,b). As micotoxinas são

categorizadas em função de sua estrutura e modo de ação, sendo que uma mesma espécie de fungo pode produzir várias micotoxinas ou várias espécies diferentes de fungos podem produzir uma mesma micotoxina (D'MELLO, 1997), com diferentes atuações em animais ruminantes de não-ruminantes (EATON et al. 1994).

Segundo D'MELLO (1997), o fungo *Penicillium viridicatum* tem como principal micotoxina a ocratoxina A (OTA), que também é reportada em espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*. Essa substância é quimicamente descrita como 3,4-dihidrometilisocumarina, derivadas de uma ligação amida com um grupamento amina da L- $\beta$ -fenilalanina (COLE e COX, 2001). Estes compostos são conhecidos por seus efeitos nefrotóxicos em aves, ratos, chegando a promover tumores em humanos (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Essa toxina foi primeiramente isolada em *Aspegillus ochraceus* e depois apresentada como metabólito secundário em espécies de *Penicillium*, de regiões de clima temperado (SMITH e ROSS, 1991).

Muitas espécies de *P. viridicatum* e *P. verrucossum* podem ser diferenciadas em nível de subespécie de acordo com a produção de OTA e patulina, visto que dentro de uma mesma espécie, pode não haver produção de determinada micotoxina. Essa diferença na produção também foi observada como dependente do diâmetro da colônia e da sua coloração (PITT, 1987) e de meios seletivos com antibióticos e antifúngicos (FRISVAD, 1983).

As micotoxinas são muito resistentes, suportando até 200°C. Sua atividade tóxica persiste por um longo tempo nos alimentos, mesmo após o desaparecimento dos bolores que as originaram. A produção de toxinas depende de vários fatores como temperatura, umidade, ventilação e substrato de crescimento.

Cerca de 30% das pesquisas realizadas no Brasil sobre micotoxinas foram de ocorrência em alimentos e rações. As aflatoxinas em amendoim e produtos de

amendoim continuam sendo um problema alarmante, e a alta incidência e níveis elevados de fumonisinas em milho e produtos de milho. A ocorrência de micotoxinas em leite, laticínios e suco de maçã precisam ser verificadas, pois há uma certa divergência nos resultados ( RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002).

Em fermentação semi-sólida os substratos utilizados geralmente são resíduos e subprodutos agrícolas que podem apresentar crescimento fúngico e conseqüentemente a produção de micotoxinas antes de serem submetidos ao processo de fermentação. Como os microrganismos utilizados durante a fermentação geralmente são fungos para produção de enzimas que serão utilizados em alimentos, tem que ser considerada uma investigação sobre a presença de micotoxinas para não causarem mal ao consumidor final.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a produção de Aflatoxinas e Ocratoxinas pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584 durante o processo fermentativo para a obtenção das pectinases;
- Avaliar a viabilidade do uso da enzima bruta na extração do suco de frutas e vegetais.

### **3. MATERIAL e MÉTODOS**

#### **3.1. Aplicação da enzima na extração e clarificação de suco.**

As soluções enzimáticas brutas, com perfil enzimático conhecido (obtidas como especificado no capítulo II), foram aplicadas (3 mL) na extração de sucos de banana, maçã e cenoura. Os frutos foram processados e uma alíquota teve o pH corrigido para o ótimo da enzima. Amostras de 15 g, com pH natural da banana (5,0), da maçã (3,5) e cenoura (5,5) e corrigidos até o pH ótimo da enzima (5,5), com tampão Tris/HCl 0,5M, pH 8,0, foram mantidas a temperatura ambiente e a 50°C por períodos de 1 e 2 horas (Figura 3.2.1). O controle do processo ocorreu pela adição de água (3 mL) no lugar da solução enzimática. O processo de extração a vácuo ocorreu através do uso de uma prensa mecânica desenvolvida no próprio laboratório. Os testes foram feitos em triplicatas e a análise de dados ocorreu inicialmente pela análise da eficiência da enzima em relação à água através da ANOVA. O volume de suco extraído pela enzima foi analisado através de um delineamento fatorial 2<sup>3</sup> completo (temperatura x pH x tempo de extração). Os experimentos foram codificados agrupando-se temperatura + pH e tempo de ação para o uso de enzima ou água (controle) para extração do suco como mostra a Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Codificação dos dados para realização dos experimentos de extração de sucos.

<b>Cod.</b>	<b>Descrição das condições do ensaio</b>
AN1	Enzima, 25°C, pH natural, 1 hora
AN1C	Água, 25°C, pH natural, 1 hora
AN2	Enzima, 25°C, pH natural, 2 horas
AN2C	Água, 25°C, pH natural, 2 horas
ON1	Enzima, 50°C, pH natural, 1 hora
ON1C	Água, 50°C, pH natural, 1 hora
ON2	Enzima, 50°C, pH natural, 2 horas
ON2C	Água, 50°C, pH natural, 2 horas
AO1	Enzima, 25°C, pH 5,5, 1 hora
AO1C	Água, 25°C, pH 5,5, 1 hora
AO2	Enzima, 25°C, pH 5,5, 2 horas
AO2C	Água, 25°C, pH 5,5, 2 horas
OO1	Enzima, 50°C, pH 5,5, 1 hora
OO1C	Água, 50°C, pH 5,5, 1 hora
OO2	Enzima, 50°C, pH 5,5, 2 horas
OO2C	Água, 50°C, pH 5,5, 2 horas

### 3.2. Testes para quantificação de micotoxinas

Foram realizados testes para determinar a presença de micotoxinas no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo (*P. italicum* IZ 1584) utilizado na produção de pectinases que foram aplicados na extração dos sucos de frutas e vegetal.

#### 3.2.1 Quantificação de aflatoxinas

Para a presença de aflatoxinas totais no meio fermentativo foram feitos testes semi-quantitativos através do uso do kit rápido de detecção AFLASCAN® obtido da Rhone diagnosties, que se utiliza de colunas de imunoafinidade e detectores de fluorescência para detectar a presença da toxina.

Para o processo foram utilizados 50 g do material fermentado acrescido de 4 g de NaCl e 250 mL de metanol a 60%, agitado por 1 minuto a alta velocidade. Após agitação, o material foi diluído em 250 mL de água destilada. Cerca de 50 a 100 mL do material foi filtrado e aplicado na coluna de imunoafinidade, numa velocidade de eluição de 2 a 3 mL por minuto. A seguir a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada, sendo aplicado 1 mL de metanol para eluição do material adsorvido (1 gota por segundo). O volume eluído foi coletado num tubo ao qual adicionou-se 1 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio. Estes foram agitados e novamente introduzidos na coluna de imunoafinidade, conectada a uma ponteira indicadora de fluorescência. A presença de aflatoxina foi quantificada pela leitura da ponteira em luz UV 366 nm, comparando-se ao cartão padrão fornecido pelo kit. Foram feitos também os testes para o substrato esterilizado suspenso em água destilada para se detectar a presença da toxina neste, antes do inóculo do fungo.

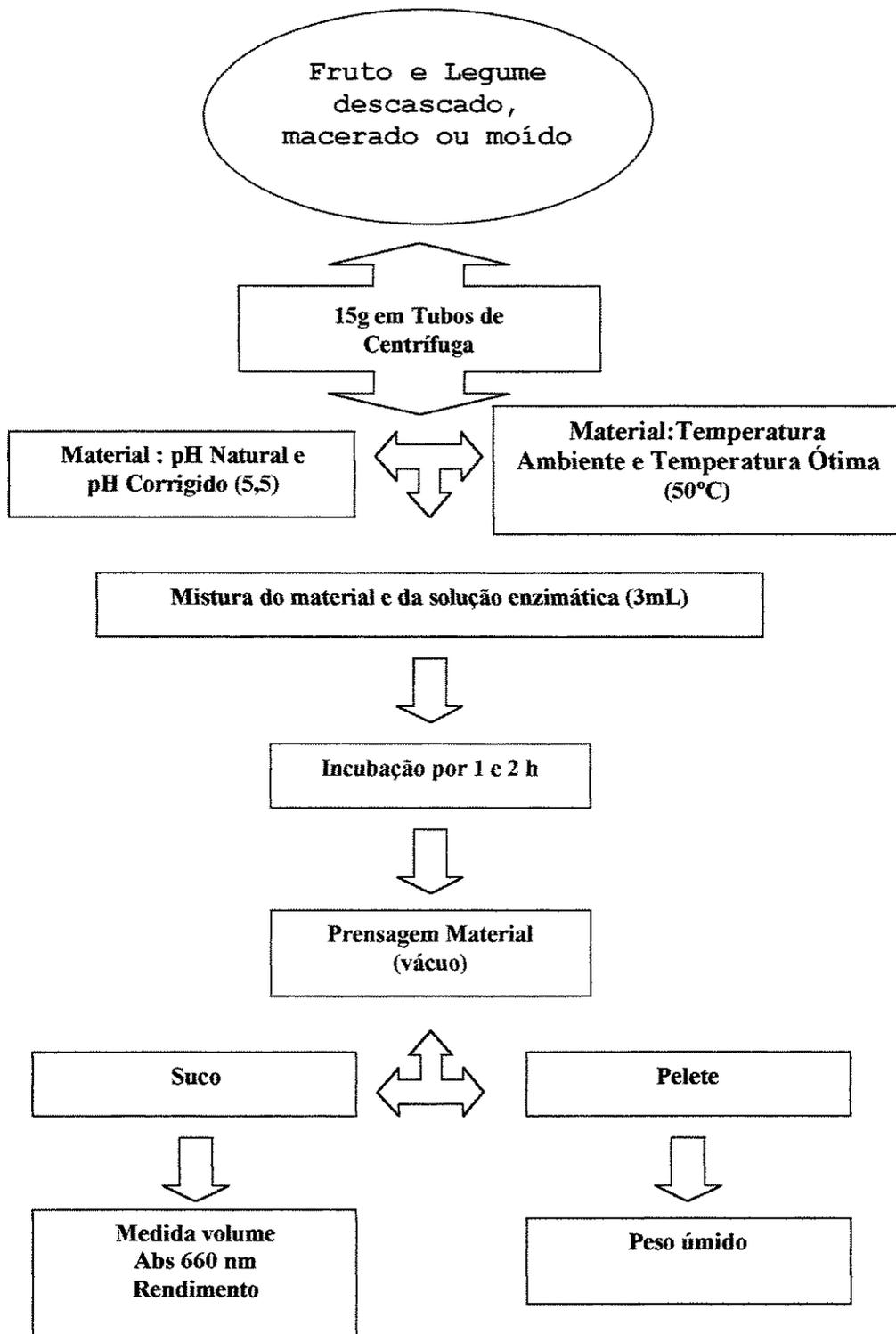


Figura 3.2.1. Fluxograma do processo de extração de suco (SILVA, 2003)

### **3.2.2. Quantificação de ocratoxinas totais**

Para a quantificação de ocratoxinas totais foi utilizado o Kit OCHRASCAN® obtido da Rhone diagnostics. Para a extração da toxina foram utilizados 10 g do material fermentado misturado a 200 mL de uma solução de bicarbonato de sódio a 1% e agitado por 2 minutos. O material foi filtrado e 20 mL foram aplicados na coluna de imunoafinidade numa velocidade de 2 a 3 mL por minuto. Posteriormente, a coluna foi lavada com uma solução de 20% de metanol (5 mL/min). A toxina foi eluída da coluna com 1,5 mL de uma mistura de ácido acético: metanol (2:98 v/v) e coletada em tubo teste. Ao volume coletado, foram adicionados 6 mL de tampão fosfato e 3 mL de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente e após separadas as fases, a porção superior foi descartada. O restante do material foi aplicado na ponteira indicadora e, para identificação da banda fluorescente, foi feita a leitura em lâmpada UV a 366 nm e comparada a quantidade de toxina produzida com o cartão de identificação fornecido. Foram feitos também os testes para o substrato esterilizado para se detectar a presença da toxina antes do inóculo do fungo.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1. Testes de Micotoxinas

Os testes para pesquisa de micotoxinas (aflatoxina e ocratoxina) foram realizados no substrato (bagaço de laranja industrializado) não fermentado e nos substratos fermentados pelo fungo *P. italicum* IZ 1584.

Foram detectados níveis de aflatoxina total de até 10 ppb (10 µg/Kg) e níveis de 4 ppb (4 µg/Kg) para ocratoxina no substrato não fermentado que foram utilizados como controles. O substrato fermentado utilizado para pesquisa de micotoxinas foi obtido após o sexto dia de fermentação, no qual foi obtido o maior valor de atividade enzimática e conseqüentemente, usada para a obtenção da solução enzimática bruta para aplicação. Foram detectados níveis de até 10 ppb (10 µg/Kg) e até 4 ppb (4µg/Kg) de aflatoxina e ocratoxina, respectivamente (Tabela 4.1).

Pode-se observar pela Tabela 4.1 que os níveis de aflatoxina encontrados nos substratos fermentado e não fermentado não foram diferentes, indicando que o fungo em questão não é um produtor de aflatoxina no substrato utilizado em FSS. Os níveis de aflatoxina encontrados no substrato não fermentado podem ter sido produzidos por outros fungos produtores de aflatoxinas que se desenvolveram no substrato antes dos experimentos, pois a falta de controle da umidade e temperatura durante a estocagem e o clima tropical, favorecem a proliferação de fungos que crescem em condições favoráveis em grande variedade de substratos (SANTOS, et al., 2001).

Quanto à ocratoxina, pode-se observar níveis até 10 ppb no substrato não fermentado e uma redução de 60% da micotoxina no substrato fermentado (Tabela 4.1). Durante o processo de fermentação, pode ter ocorrido degradação

**Tabela 4.1.** Níveis de aflatoxina e ocratoxina detectados no substrato fermentado e não fermentado.

Substrato	Bagaço de laranja (controle)	Bagaço de laranja (fermentado)	Tolerância segundo legislação do (Brasil)	Tolerância segundo Legislação de (outros países)
<b>Aflatoxina</b>				
(ppb)	< 10	<10	30	5 - 50
<b>Ocratoxina</b>				
(ppb)	10 - 20	< 4	-	25

dessas substâncias pelo fungo em estudo, levando à redução dos níveis de ocratoxina. Foi observado também por SILVA (2003) níveis de aflatoxina e ocratoxina menores no substrato fermentado por *P. veritatum*, em FSS, do que aqueles detectados no substrato antes da fermentação. Outros pesquisadores também observaram degradação de micotoxinas por algumas espécies fúngicas, com formação de aminoácidos e de produtos com menos toxicidade (WOGAM, 1966; VARGA, 2000).

Comparando os valores encontrados nos dois substratos com os valores permitidos pela legislação (Tabela 4.1), pode-se observar que a solução enzimática obtida pelo cultivo *P. italicum* IZ 1584 em bagaço de laranja industrializado, pode ser utilizado em alimentos.

#### 4.2. Uso das Enzimas na Extração de sucos

Foi utilizada solução enzimática bruta para extração de suco de banana, maçã e cenoura. Foram realizados ensaios variando-se o pH do material macerado (pH natural e 5,5), a temperatura (ambiente e 50°C) e o tempo de extração (1 e 2 horas). Os experimentos foram organizados em esquema fatorial 2<sup>3</sup> completo como descrito na tabela 3.1.

### 4.2.1. Extração do suco de banana

Para a extração do suco de banana, a fruta foi macerada e 15 g misturados a 3 mL da solução enzimática bruta ou água (controle), com pH natural (pH = 4,65) ou corrigido a 5,5. A análise estatística, através do teste F, mostrou que houve diferenças significativas a 1% de probabilidade, para os efeito do bloco e dos tratamentos, ou seja, houve variação significativa no volume de suco extraído, em função do tratamento aplicado como mostra a tabela 4.2.1.

**Tabela 4.2.1:** Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de banana.

<b>Causas de Variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
Bloco	2	3.9404	1.9702	7.68**
(Tratamentos)	15	388.4015	25.8934	100.98**
Resíduo	30	7.6929	0,2564	-
Total	47	400.0348	-	-

NS Interação não significativa, \*\* Interação significativa a 1% de probabilidade, \* Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey mostrou que nos tratamentos nos quais foi utilizada a solução enzimática, houve maior extração do suco. A média geral do ensaio foi de  $7,73 \pm 0,72$  U/mL de suco extraído como mostra Tabela 4.2.2.

A partir desses dados, prosseguiu-se as análises estatísticas considerando apenas os tratamentos nos quais foi utilizada a solução enzimática bruta.

Os volumes do suco de banana extraídos com o uso da enzima foram influenciados pelas condições de temperatura, pH e tempo de extração a 1% de probabilidade. A média de extração do ensaio foi de  $10,14 \pm 0,92$  mL, mostrados na Tabela 4.2.3.

**Tabela 4.2.2:** Teste de Tukey para as médias da extração do suco de banana dentro dos tratamentos

Tratamentos	$\Delta$	Média
Enzima, 50°C, pH 5,5, 2 h	2,7554	11,53 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH 5,5, 2 h	2,7554	11,40 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH 5,5, 1 h	2,7554	10,40 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH NATURAL (4,65), 2 h	2,7554	10,53 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH NATURAL (4,65), 2 h	2,7554	10,33 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH 5,5, 1 h	2,7554	9,70 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH NATURAL (4,65), 1 h	2,7554	9,6 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH NATURAL (4,65), 1 h	2,7554	7,66 <sup>A</sup>
Água, 25°C, pH NATURAL (4,65), 1 h	2,7554	6,80 <sup>B</sup>
Água, 50°C, pH 5,5, 2 h	2,7554	6,80 <sup>B</sup>
Água, 50°C, pH NATURAL (4,65), 2 h	2,7554	6,00 <sup>B</sup>
Água, 25°C, pH 5,5, 2 h	2,7554	5,20 <sup>B</sup>
Água, 25°C, pH NATURAL (4,65), 2 h	2,7554	5,00 <sup>B</sup>
Água, 25°C, pH 5,5, 1 h	2,7554	4,80 <sup>B</sup>
Água, 50°C, pH NATURAL (4,65), 1 h	2,7554	4,40 <sup>B</sup>
Água, 50°C, pH 5,5, 1h	2,7554	3,50 <sup>B</sup>

Letras iguais = não há diferença significativa

Letras diferentes = diferença significativa

O teste de Tukey aplicado dentro de cada fator, indicou que não houve diferença significativa nas condições ótimas para as atividades de exo e endo-PG para as temperaturas de 50 e 25°C e pH 5,5 e natural (5,0), respectivamente (Tabela 4.2.4).

**Tabela 4.2.3:** Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração.

<i>Causas de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.Q.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F</i>
Temperatura (T)	1	16.5004	16.5004	23.0105**
pH (p)	1	6.1004	6.1004	8.5073 **
Tempo Ação (t)	1	3.3004	3.3004	4.6026 **
Fator T x p	1	1.3537	1.3537	1.8879 <sup>ns</sup>
Fator T x t	1	0.3038	0.3038	0.4236 <sup>ns</sup>
Fator p x t	1	3.1537	3.1537	4.3980 *
Fator T x p x t	1	1.0837	1.0837	1.513 <sup>NS</sup>
(Tratamentos)	7	31.7962	4.5423	-
Resíduo	16	11.4733	0.7171	-
Total	23	43.2695	-	-

NS Interação não significativa, \*\* Interação significativa a 1% de probabilidade, \* Interação significativa a 5% de probabilidade.

**Tabela 4.2.4:** Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das enzimas dentre os diferentes tratamentos.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Tempo ação (h)</b>	<b>Δ</b>
50 (12,93) <sup>A</sup>	5,5 (13,16) <sup>A</sup>	2 (12,95) <sup>A</sup>	0,9986
25 (12,42) <sup>A</sup>	Natural (12,20) <sup>A</sup>	1 (12,40) <sup>A</sup>	0,9986

Letras iguais = não há diferença significativa  
Letras diferentes = diferença significativa

### 4.3. Extração de Suco de Maçã

Para a extração do suco de maçã, foram aplicados os mesmos tratamentos descritos para o ensaio anterior. A análise de variância indicou a eficiência da solução enzimática, em relação ao controle, para a extração do suco. O teste F mostrou que houve uma variação significativa de probabilidade na eficiência de extração dentro dos blocos e dentre os tratamentos ocorreu interação significativa de 1%, como mostra a Tabela 4.3.1.

**Tabela 4.3.1.** Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de maçã

<b>Causas de Variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
Bloco	2	0.1838	0.0919	0.04 <sup>ns</sup>
(Tratamentos)	15	228.9448	15.2630	6.51 <sup>**</sup>
Resíduo	30	70.3296	2.3443	-
Total	47	229.4581	-	-

NS Interação não significativa, \*\* Interação significativa a 1% de probabilidade, \* Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey mostrou que os maiores volumes médios de suco extraído foram obtidos quando a enzima estava presente no tratamento aplicado, principalmente nas condições otimizadas. A média geral do ensaio foi de  $10,70 \pm 0,87$  mL de suco extraído ( tabela 4.3.2).

**Tabela 4.3.2.** Teste de Tukey para as médias da extração do suco de maçã dentro dos tratamentos

<b>Tratamentos</b>	<b><math>\Delta</math></b>	<b>Média</b>
Enzima, 50°C, pH 5,5, 2 h	2,6493	14,00 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH 5,5, 2 h	2,6493	14,00 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH NATURAL (3,5), 2 h	2,6493	13,00 <sup>AB</sup>
Enzima, 50°C, pH 5,5, 1 h	2,6493	12,83 <sup>AB</sup>
Enzima, 50°C, pH NATURAL (3,5), 1 h	2,6493	12,00 <sup>ABC</sup>
Água, 50°C, Ph NATURAL (3,5), 2 h	2,6493	11,83 <sup>ABC</sup>
Água, 50°C, pH 5,5, 1 h	2,6493	11,50 <sup>ABC</sup>
Enzima, 25°C, pH NATURAL, 2 h	2,6493	11,33 <sup>ABC</sup>
Enzima, 25°C, pH 5,5, 1 h	2,6493	11,00 <sup>ABC</sup>
Água, 25°C, pH 5,5, 2 h	2,6493	10,33 <sup>ABCD</sup>
Água, 50°C, pH NATURAL, 1 h	2,6493	10,00 <sup>ABCD</sup>
Água, 50°C, pH 5,5, 2 h	2,6493	9,00 <sup>BCD</sup>
Enzima, 25°C, pH NATURAL, 1 h	2,6493	9,00 <sup>BCD</sup>
Água, 25°C, pH NATURAL (3,5), 2 h	2,6493	8,00 <sup>CD</sup>
Água, 25°C, pH NATURAL (3,5), 1 h	2,6493	8,00 <sup>CD</sup>
Água, 25°C, pH 5,5, 1 h	2,6493	6,2667 <sup>D</sup>

Letras iguais = não há diferença significativa  
Letras diferentes = diferença significativa

A aplicação da análise de variância somente para os tratamentos nos quais foi utilizada a enzima indicou, efeitos significativos (ao nível de 1%), do fator pH e para o fator temperatura (5% de probabilidade). Para o tempo de extração não houve interação significativa. A média de extração do ensaio foi de  $12,145 \pm 1,37$  mL (Tabela 4.3.3).

**Tabela 4.3.3.** Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração

<i>Causas de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.Q.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F</i>
Temperatura (T)	1	7.5938	7.5938	4.4724*
pH (p)	1	15.8438	15.8438	9.3313**
Tempo Ação (t)	1	1.2604	1.2604	0.7423 <sup>ND</sup>
Fator T x p	1	2.3437	2.3437	1,3804 <sup>NS</sup>
Fator T x t	1	5.5104	5.5104	3.2454 <sup>NS</sup>
Fator p x t	1	0.5104	0.5104	0,3006 <sup>NS</sup>
Fator T x p x t	1	1.7604	1.7604	1.0368 <sup>NS</sup>
(Tratamentos)	7	34.8229	4.9747	-
Resíduo	16	27.1667	1.6979	-
Total	23	61.9896	-	-

NS Interação não significativa, \*\* Interação significativa a 1% de probabilidade, \* Interação significativa a 5% de probabilidade.

Os testes de Tukey para os tratamentos em separado revelaram contrastes significativos entre as médias sendo observado que as condições ótimas para as atividades das PGs levaram a maiores volumes de suco extraídos (Tabela 4.3.4).

**Tabela 4.3.4.** Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de maçã com o uso das enzimas dentre os diferentes tratamentos

Temperatura (°C)	pH	Tempo ação (h)	$\Delta$
50 (12,66) <sup>A</sup>	5,5 (12,58) <sup>A</sup>	2 (12,67) <sup>A</sup>	1,1566
25 (10,95) <sup>B</sup>	Natural (11,00) <sup>B</sup>	1 (10,91) <sup>B</sup>	1,1566

Letras iguais = não há diferença significativa

Letras diferentes = diferença significativa

#### 4.4. Extração de Suco de Cenoura

Para a extração do suco de cenoura os mesmos procedimentos descritos anteriormente, foram seguidos. A análise de variância, realizada para a comparação entre o uso da enzima ou de água nos tratamentos, mostrou uma diferença significativa a 1% de probabilidade entre os mesmos e não apresentou interação significativa nos blocos, como mostra Tabela 4.4.1.

**Tabela 4.4.1.** Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de cenoura

<b>Causas de Variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
Bloco	2	1.5775	0.7887	1.27 <sup>NS</sup>
(Tratamentos)	15	35.2396	5.0342	8.135 <sup>**</sup>
Resíduo	30	8.6692	0,6192	-
Total	47	45.4862	-	-

NS Interação não significativa, \*\* Interação significativa a 1% de probabilidade, \* Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey, aplicado para os tratamentos, mostrou que não houve diferenças significativas entre os volumes médios de suco extraído nas diferentes condições, porém nota-se que as maiores médias foram obtidas na presença da enzima e nas condições ótimas para a ação da mesma. A média geral do ensaio foi de  $8,04 \pm 0,77$  U/mL de suco extraído (Tabela 4.4.2).

**Tabela 4.4.2.** Teste de Tukey para as médias da extração do suco de cenoura dentro dos tratamentos

Tratamentos	$\Delta$	Média
Enzima, 50°C, pH NATURAL, 1h	2,34	9,16 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH 5,5, 1h	2,34	9,16 <sup>A</sup>
Água, 50°C, pH NATURAL, 2h	2,34	9,03 <sup>A</sup>
Água, 50°C, pH 5,5, 2h	2,34	9,00 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH NATURAL, 2h	2,34	9,00 <sup>A</sup>
Enzima, 50°C, pH 5,5, 2h	2,34	9,00 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH 5,5, 1h	2,34	8,33 <sup>A</sup>
Água, 50°C, pH NATURAL, 1h	2,34	8,00 <sup>A</sup>
Água, 50°C, pH 5,5, 1h	2,34	8,00 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH NATURAL, 1h	2,34	8,00 <sup>A</sup>
Água, 25°C, pH NATURAL, 1h	2,34	7,00 <sup>A</sup>
Água, 25°C, pH NATURAL, 2h	2,34	7,00 <sup>A</sup>
Água, 25°C, pH 5,5, 2h	2,34	7,00 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH NATURAL, 2h	2,34	7,00 <sup>A</sup>
Enzima, 25°C, pH 5,5, 2h	2,34	7,00 <sup>A</sup>
Água, 25°C, pH 5,5, 1h	2,34	6,96 <sup>A</sup>

Letras iguais = não há diferença significativa

Letras diferentes = diferença significativa

Quando analisados somente os tratamentos na presença da enzima, os volumes de suco de cenoura extraídos apresentaram diferenças significativas, a 1% de probabilidade, apenas para o fator temperatura, segundo a análise de variância. Os demais fatores não foram capazes de promover um efeito significativo durante o processo de extração de sucos. A média de extração do ensaio foi de  $8,29 \pm 1,12$  mL (Tabela 4.4.3).

**Tabela 4.4.3.** Análise de variância da extração do suco de cenoura utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração

<b>Causas de Variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
Temperatura (T)	1	15,0417	15,0417	11,83**
pH (p)	1	0,0000	0,0000	0,00 <sup>NS</sup>
Tempo Ação (t)	1	2,0417	2,0417	1,60 <sup>NS</sup>
Fator T x p	1	0,0000	0,0000	0,00 <sup>NS</sup>
Fator T x t	1	1,0417	1,0417	0,81 <sup>NS</sup>
Fator p x t	1	0,0000	0,0000	0,00 <sup>NS</sup>
Fator T x p x t	1	0,0000	0,0000	0,00 <sup>NS</sup>
(Tratamentos)	7	18,1250	2,5893	-
Resíduo	16	20,3333	1,2708	-
Total	23	38,4583	-	-

NS Interação não significativa, \*\* Interação significativa a 1% de probabilidade, \* Interação significativa a 5% de probabilidade.

Foi realizado o teste de Tukey para os tratamentos com a presença da enzima que revelou uma diferença significativa de médias apenas para a temperatura, com maior volume extraído a 50°C. Não houve diferença significativa para o fator pH, o que já era esperado visto que o pH da cenoura (5,0) foi muito próximo ao pH ótimo da enzima. Também não foi detectado diferença significativa para o fator tempo de ação enzimática (de extração) (Tabela 4.4.4).

**Tabela 4.4.4.** Análise de variância da extração do suco de cenoura utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Tempo ação (h)</b>	<b>Δ</b>
50 (9,08) <sup>A</sup>	Natural (8,29) <sup>A</sup>	1 (8,58) <sup>A</sup>	0,9763
25 (7,50) <sup>B</sup>	5,5 (8,29) <sup>A</sup>	2 (8,00) <sup>A</sup>	0,9763

Letras iguais = não há diferença significativa  
Letras diferentes = diferença significativa

Na extração do suco de banana com extrato enzimático obteve-se um rendimento de 77%. Este rendimento foi acompanhado da diminuição da viscosidade, o que é um fator muito importante, pois a alta viscosidade em sucos não é desejável por dificultar a extração e filtração acarretando no aumento do tempo de processamento, gasto com energia para aquecimento, prensagem e centrifugação. Esta redução na viscosidade também foi observado por CARDOSO et al. (1998) quando utilizaram a enzima comercial Clarex de origem fúngica (*Aspergillus*) que normalmente é empregada no processamento de frutas e vegetais em purês de banana. Os autores obtiveram valores de rendimento de 61,1%, cerca de 16% menor que o rendimento obtido neste trabalho.

A extração do suco de maçã apresentou rendimento de 93% quando foi utilizada a solução enzimática, valor considerado bom se comparado com os valores obtidos por GOMES et al. (2001) e IEMBO (2000) que foi de 10%. SINGH et al. (1999) utilizaram pectinases de *A. carbonarius* e *A. niger* na extração de suco de maçã e obtiveram 81 e 75% de eficiência, respectivamente.

CARRÍN et al. (2001) utilizaram as enzimas pectinase/amilase co-imobilizadas na clarificação de suco de maçãs obtendo aumento de 35% no fluxo contínuo da ultrafiltração comparado com a enzima comercial.

Na extração do suco de cenoura foi observado 60% de rendimento. Durante o processo de extração do suco da banana, maçã e cenoura pode-se observar que o rendimento do suco de maçã foi maior, cerca de 25% em relação a banana e 27,8% em relação a cenoura. A maçã possui uma quantidade maior de pectina em sua composição (0,5 a 1,6%) em relação a banana e a cenoura. A quantidade de pectina existente nos vegetais, é um fator importante na extração do suco, pois a enzima vai atuar na cadeia de pectina, rompendo as células e liberando o suco livre. Sendo assim, o vegetal com maior quantidade de pectina na sua estrutura, é o que apresentará maior quantidade de suco extraído.

Comparando esse resultado com SILVA (2003) e SOARES et al. (2001) que utilizaram um "pool" de enzimas para extração de suco de banana, maçã e cenoura, obtidas por *Penicillium viridicatum* e várias linhagens de *Bacillus*, respectivamente, o primeiro obteve resultados muito próximos aos resultados obtidos neste trabalho e o segundo obteve rendimento 50% menor para a extração do suco de cenoura e para o de banana os valores foram muito próximos.

Para extração de sucos de vegetais, a variedade e o ponto de maturação são importantes para se obter ótimos resultados. A dosagem da enzima vai depender da temperatura utilizada e do tempo de maceração. Os vegetais utilizados neste trabalho apresentaram ponto de maturação, pH e temperatura adequados para o processamento do suco, visto que as enzimas comerciais atuam em pH de 3,0 a 5,0 e temperaturas de 5 a 55°C.

## **5. CONCLUSÕES**

- Os níveis de aflatoxinas e ocratoxina encontrados no substrato fermentado e não fermentado indicaram que o fungo em estudo não é produtor de micotoxinas e os níveis das mesmas, nas soluções enzimáticas obtidas, estão dentro dos limites aceitáveis pela legislação brasileira e internacional;
- Na extração de sucos, a análise estatística, através do teste de Tukey, mostrou que os volumes de suco de banana extraídos com o uso da enzima, sob condições de pH, temperatura e tempo de extração, foram influenciados por estas condições, a 1% de probabilidade. Para o suco de maçã, os maiores volumes médios de suco extraído foram obtidos quando a enzima estava presente no tratamento aplicado, principalmente nas condições otimizadas e para o suco de cenoura, não houve diferenças significativa entre os volumes médios de suco extraído nas diferentes condições.

## **VII. CONCLUSÕES FINAIS**

- A produção de pectinases em embalagens de polipropileno utilizando como substrato bagaço de laranja industrializado, foi de extrema importância para que as outras etapas deste trabalho pudessem ser realizadas;
- O melhor método para extração do extrato enzimático foi com o tempo de 60 minutos de agitação com o solvente tampão tris-HCl pH 8,0;
- O estudo da produção de pectinases em reator de coluna foi mais eficiente comparado com as embalagens de polipropileno, onde houve redução no tempo do processo fermentativo e valores maiores de atividade enzimática;
- O estudo de diferentes umidades do meio fermentativo mostrou ser efetivo no crescimento do microrganismo e produção da enzima,;
- A aeração do meio foi de extrema importância na remoção do calor gerado pelo microrganismo no interior da coluna, onde proporcionou melhor crescimento do fungo e maior produção das enzimas;
- O estudo da influência da densidade aparente no meio de cultivo mostrou que quanto maior a densidade aparente do meio de fermentação, maior é a temperatura gerada pelo calor metabólico liberado causando redução no crescimento microbiano e na atividade enzimática;
- O material inerte utilizado (bagaço de cana) foi eficiente na dissipação do calor gerado pelo microrganismo ao longo do processo fermentativo;

- O processo de separação das enzimas estudadas em coluna gel Sephadex G-75, mostrou-se efetivo, com bons valores de rendimento quando comparados com a enzima bruta;
- A enzima em estudo é uma polimetilgalacturonase;
- O extrato enzimático produzido pelo fungo em questão pode ser utilizado em alimentos, pois este não é produtor de micotoxinas e os níveis das mesmas encontradas no extrato enzimático, estão dentro dos limites aceitáveis pela legislação;
- O extrato enzimático obtido neste trabalho mostrou-se efetivo na extração de sucos de maçã, banana e cenoura.

## VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ABRAMSON, D.; HULSARE, R.; WHITE, N. D. G.; JAYAS, D. S.; MARQUARDT, R. R.** Mycotoxin Formation In Hulless Barley During Granary Storage At 15 And 19% Moisture Content. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, p. 291-305, 1999.

**ACUÑA-ARGÜELLES, M. E.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZALES, G.; FAVELA-TORRES, E. A. D.** Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied-microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 808-814, Jan 1995.

**AGÊNCIA BRASIL - Abr: (in)**  
[www.casabaiana.com.br/noticias/2003/cienciasetecnologia/12.htm](http://www.casabaiana.com.br/noticias/2003/cienciasetecnologia/12.htm)

**AGUILAR, G.; HUITRÓN, C.** Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp CH-Y-1043 on different carbon source. **Biotechnology Letters**, México, v. 12, n. 9, p. 655-660, May 1990.

**ALAÑA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M. D.; DOMINGUES, 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.

**ALAÑA, 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.

**ALBERSHEIM, P; KILLIAS, U.** Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 97: 107 – 115, 1962.

- ALBERSHEIM, P.** Pectin lyase from fungi. **Meth. Enzymology**. V628-631, 1966.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERAA, J. L.** Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- ALVES-PRADO, H.** Isolamento e Caracterização de enzimas microbianas. **Trabalho e conclusão de curso**. Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus Rio Claro - SP, 2002.
- AMISTANDEN, L. C.** Estudo sobre a ação de pectinaesterase em suco de laranja. Campinas, 1992. 188 p. Tese de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.
- ANTIER, P.; MINJARES, A.; ROUSSOS,S; RAIMBAULT, M. & VINIEGRA-GONZALEZ, G.** Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffe pulp. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 15, n.3, p.254-260, 1993.
- ARAMAKI, I.; HUKUDA, K.; HASHIMOTO, T.; ISHIKAWA, T.; KISAKI, K.; OKASAKI, N.** Near infrared diffuse reflectance spectrophotometric analyses of mycelial weight in rice-kogi and search for characteristic wavelength for mycelia. **Seibutsu-kogaku Kaishi**. V. 73, 1995.
- ATKINSON, B.** **Biochemical Reactors**. Pion Limited, London, 1984, 267 pp.
- AZIZ, N. H.; YOUSSEF, Y. A.; EL-FOULY, M. Z.; MOUSSA, L. A.** Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, V. 39, p. 279-285, 1998.
- BAJRACHARYA, R.; MUDGETT, R. E.** Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. **Biotechnology Bioengineering**, v. 22, p. 2219-2235, 1980.

**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.

**BELON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P.** Sensors and measurements in solid state fermentation; a review. **Process Biochemistry**. V. 38, p. 881-896, 2003.

**BE MILLER, J. N.** Na introduction to pectins: Struture and properties. In: Fishman, M. L.; Jen, J. J. (Eds), Chemistry and functions of pectins, ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington, D. C., 1986. (Apud) Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

**BEROVIC, M. ; LOGAR-DERENCIN,M.** Solid state fermentation of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** **56(2)**: 209-211, 1993.

**BEROVIC, M. & OSTROVERSNIK, H.** Production of *Aspergillus niger* pectinolytic enzymes by solid-state bioprocessing of apple pomace. **J. Biotechnol.**, 53, 1, 47-53, 1997.

**BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ, M. SERRANO, L.; VINIEGRA, G. G.** Production of Pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. **Journal Food Science Technology**. V. 31, p. 22-26, 1994.

**BORIN, M. F.; SAID, S.; FONSECA, M. J.** Purification and Biochemical characterization of an extracellular endopoligalacturonase from *Penicillium frequentans*. **Journal Agricultural Food Chemistry**. V. 44, p. 1616- 1620, 1996.

**BRADFORD, M. M.** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 284-254, 1976.

**BRAVO, E. C. V.; CARVALHO, E. P. C.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C., PILON, L.** Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciências Agrotec**. V. 24, p. 137-152, 2000.

**BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, 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**, v.9, p. 225-228, 1993.

**CARDOSO, M. H.; JACKIX, M.N.H.; MENEZES, H.C.** Efeito da associação de pectinase, invertase e glicose isomerase na qualidade do suco de banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. V. 18, n.3, 1998.

**CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A.** Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**. V. 34. P. 181-186, 1999.

**CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M.** Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology** v. 71, p.45-50, 2000.

**CANNEL, E., MOO-YONG, M.** Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.15, p. 24-8, 1980.

**CARRIZALEZ, V., RODROGUEZ, H. & SARDINA, I.** Determination of specific growth of molds on semi-solid cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p. 321-333, 1981.

**CAVENAGHI, M. E. Produção de Pellets** – Trabalho realizado para a disciplina Tecnologia de Frutas e Hortaliças, 1º semestre/1995. IBILCE – UNESP- São José do Rio Preto-SP.

**CECI, L.; LOZANO, J.** Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. **Food Chemistry**, v. 61, p. 237-241, 1998.

**CHANG, C.S.; LAI, F. S.; MILLER, B. S.** Thermal conductivity and specific heat of grain dust. **Transactions of the ASAE**, v. 23, p. 1303-1306, 1980.

**CHANG, C. S.** Thermal conductivity of wheat, corn and grain sorghum as affected by bulk density and moisture content. **Transactions of the ASAE**, v. 29, p. 1446-1450, 1986.

**COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F.; COURI, S.** Partial purification of polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B. **Rev. Microbiol.**, v. 26, n.4, p. 318-322, 1995.

**COLE, R. J.; COX, R. H.** **Handbook of toxic and fungal metabolites**, Academic press, New York, 1981 (Apud) **HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M.** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

**COLLA, F.; MAGAGNIN, G.; SANTOS, L.O.; VENDRUSCOLO, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V.** Utilização de fermentador tipo tambor rotativo para produção

de enzimas via SSF. In: Congresso de Fermentação Semi-sólida, 2003, Florianópolis. ANAIS...Florianópolis, 2003.

**COKER, R. D., JONES, B. D., NAGLER, M. J.** "Mytoxin Training Manual". London: Tropical Development and Research Institute, 1984.

**COOK, R.** Quality of citrus juices as related to composition and processing practices. **Food Technology**, v.37, n.6, p. 68-71, 1983.

**COSTA, J.A.V.** Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. Campinas,1996. 202 p. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.

**COUTO, S. R.; RATTO, M.; DOMINGUEZ, A.; SANROMAN, A.** Strategies for improving ligninolytic enzymes activities in semi-solid-state biorreactors. **Process Biochemistry**. V.36, p.995-999, 2001.

**COUTO, S. R.; RATTO, M.; BARREIRO, M.; RIVELA, I.; LONGO, M. A.; SANROMAN, A.** Performance of a solid-state immersion biorreactor for ligninolytic enzyme production: evaluation of different operational variables. **Process Biochemistry**. V.38, p.219-227, 2002.

**DEL BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.** Fermentação em estado sólido. In Schimidell, W.; Lima, V. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotecnologia Industrial**, Edgard Bluscher, v. 3, p. 247-276.

**DESCHAMPS, F.; RAIMBAULT, M. SENEZ, J. C.** Solid state fermentation in the development of agro-food by-products. **Industry and Environment**. V.5, p. 27-30, 1982.

**DESCHAMPS, F.; HUET, M. C.** Beta-glucosidase production in agitated solid fermentation, study of its properties. **Biotechnol. Letters**, v. 6, p. 451-456, 1984.

**DEUTSCHER, M.P.** Guide to Protein Purification. **Methods in Enzymology**, Academic Press. 182, 894p, 1990.

**DEVI, N. A.; RAO, A. G. A.** Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.59-65, 1996.

**DEVI, N. A.; RAO, A. G. A.** Effect of additives on Kinetic thermal stability of polygalacturonase II from *Aspergillus carbonarius*: mechanism of stabilization by sucrose. **Journal Agric. Food Chem.** V. 29, p. 99-107, 1998.

**D'MELLO, J. P. F.; Macdonald, A. M. C.** Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

**D'MELLO, J. P. F.; PORTER, J. K.; MACDONALD, A. M. C.; PLACINTA, C. M.** *Fusarium* mycotoxins. In: D'Mello, J. P. F. (Ed), **Handbook of Plant and Fungal Toxicans**. CRC Press, Boca Raton. P. 287-301, 1997. (Apud) D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

**DOMINGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, S. R., SANROMAN, M.A.** Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. **Process Biochemistry**. V. 37, p. 549-554, 2001.

**DURAND, A., DE LA BROISE, D., BLACHÈRE, H.** Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, v.8, p.59-66, 1988.

**EATON, D. L.; RAMSDELL, H. S.; NEAL, G. E.** Biotransformation of aflatoxins In: Eaton, J. D.; Groopman, J. D. (Eds), **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance**. Academic Press, San Diego, CA, p. 45-72, 1994 (Apud) **HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M.** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

**FARRAR, J. J.; DAVIS, R. M.** Relationship among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. **Phytopathology**, v. 81, p. 661-666, 1991.

**FARIA, J. B.; FERREIRA, R. C.; JANZANTI, N. S.** Transformações enzimáticas das substâncias pécticas da manga (*Mangífera indica* L.) v. haden no amadurecimento. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 1994. V. 14, p. 189-201.

**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.** Pectinases and pectic polysaccharides. In: **HOCKENHULL, D. J. D.** (ed.) **Progress in industrial microbiology**. London: Churchill Livingstone, 1974. v. 13, p. 59-119.

**FONSECA, M. J. V.; SAID, S.** Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 174-177, 1995.

**FREIRE, E. S.** Thermal properties of dry cocoa beans. In: Cranfield Institute of Technology. **National College of Agricultural Engineering**, p.122, 1981. (M. Sc. Thesis).

**FRISVAD, J. C.** A seletive and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 409-416, 1983.

**GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAY, M.; KALANTZI, O.** Grow conditions of *Aspergillus sp.* ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology Biotechnology**. Greece: Athens, 1997. v. 47, p. 426-429.

**GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A.** Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 93-95, 1992.

**GERHARTZ, W.** Enzymes in industry: production and applications. Weinheim: VCH, 1990. 321 p.

**GHILDYAL, N., H. P.; RAMA KRISHNA, S. V.; DEVI, P. N.; LONSANE, B. K.; ASTHANA 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.** Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors: Effects on yields and productivities. **Bioprocess Eng.** v. 8, p. 67-72, 1992.

**GUILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B. K.; KARANTH, N. G.; KRISHNAIAH, M. M.** Temperature variations and amyloglicosidase levels at different bed depths in a solid state fermentation system. **The Chemical Engineering Journal**, v. 51, p. 17-23, 1993.

**GOMES, E.; IEMBO, T.; DA SILVA, R.** Production, characterization and properties of polysaccharide depolymerizing enzymes from a strain of *Curvularia inaequalis*, **Folia Microbiol**, v.46, n.4, p. 303-308, 2001.

**GOMI, K. N.; OKAZAKI, T.; TANAKA, C.; KUMAGAI, H.; INOUE, Y.; IIMURA, Y.; HARA, S.** Estimation of micelial weight in rice-kogi with use of fungal cell wall lytic enzyme. **Journal Soc. Brew.** (Japan), v. 82, p. 130-133, 1987.

**GOWTHAMAM, M. K.; RAGHAVA, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P.; KARANTH, N. G.** Gas concentration and temperature gradients in a solid-state fermentor. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 611-620, 1993.

**GUMBIRA-SAID, E. GREENFIELDS, P. F.; MITCHELLS, D. A.; DOELLE, H. W.** Operacional parameters for packed beds in solid-state cultivation. **Biotechnology Advances**, v.11, p. 599-610, 1993.

**GUMMADI, S. N.; PANDA, T.** Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**. 38: 987-996, 2003.

**GUTIÉRREZ-ROJAS, M. S.; AURIAR, S.; REVAH, S.; BENET, J. C. (1997)** A phenomenological model for solid state fermentation of fungal mycelial growth, p. 131-142. In: **ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Ed)** **Advances in solid state fermentation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. (APUD) **SATO, K.; SUDO, S.** Small-scale solid state fermentation. Cap 5, pg 61-79. In: Demain, A. L.; Davies, J. E. (ed chief); **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. ASM Press, 2 ed, Washington, D. C. 1999.

**GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENGEDY, R.P.** Mixed Culture Solid Substrate Fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on Sugar Cane Bagasse. **Bioresource Technology**. V. 68, p. 173-178, 1999.

**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).

**HALLIDAY, P. J., PARKER, R.; SMITH, A. C.; STEER, D. C.** The thermal conductivity of maize grits and potato granules. **Journal of Food Engineering**, v. 26, p. 273-288, 1995.

**HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z.** Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**. 33: 213-218, 2002.

**HENNIES, P. T.** Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. Campinas, 1996. 68 p. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.

**HERNANDEZ, M. R. T.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S. & LONSANE, B. K.** Potencial of solid state fermentation for production or ergot alkaloids. **Letters in Applied Microbiology**, 15: 156-159, 1992.

**HESELTIME, C. W.** Biotechnology report: solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 14, n. 14, p. 517-532, Jul., 1972.

**HOURS, R. A.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J.** Apple Pomace as Raw Material for Pectinases Production in Solid State Culture. **Biological Wastes**. V. 23, p. 221-228, 1988.

**HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M.** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

**IEMBO, T.** Estudo comparativo das enzimas (hemi)-celulolíticas de um fungo e uma levedura isolados, Araraquara, 2000. 106 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Instituto de Química, **UNESP**, Universidade Estadual Paulista.

**IKASARI, L.; MITCHELL, D. A.; STUART, D. M.** Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 64, p. 722-728, 1999.

**ISHII, S.; YOKOTSUKA, T.** Purification of plant tissues by pectin transeliminase. **Agric. Food. Chem.** V. 35, p. 1157-1159, 1971.

**ISMAIL, A. S.** Utilization of Orange Peels for the Production of Multienzyme Complexes by Some Fungal Strains. **Process Biochemistry**. Egypt, 1996. v. 31, n. 7, p. 645-650.

**KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R.** Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

**KALOGERIS, E.; FOUNTOUKIDES, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.** Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**. V. 67, p. 313-315, 1999.

**KANSOH, A. L.; ESSAM, S. A.; ZEINAT, A. N.** Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesii*. **Polymer Degradation and Stability**. V. 63, p. 273-278, 1999.

**KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; DADHICH, K. S.; HOONDAL, G. S.** Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. **Process Biochemistry**. V. 36, p. 467 – 473, 2000.

**KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R.** Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. V. 77, p. 215 – 227, 2001.

**KAZARIAN, E. A.; HALL, C. W.** Thermal properties of grain. In: **Transactions of the ASAE**, v. 29, n. 02, p. 601-606, 1986.

**KERTESZ, Z. I.** The pectic substances. New York: Interscience, 1951. 628 p.

**KILARA, A.** Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. **Process Biochemistry**, v. 23, p. 35-41, 1982.

**KRIGER, N.** Apostila do Curso "Fermentação semi-sólida", Embrapa - Jaguariúna, SP, 2001.

**LEA, A. G. H.** Enzymes in the production of beverages and fruit juices. In: Tucker, G. A. And Woods, L. F. J. **Enzymes in Food Processing**, sec. Ed, Backie Academic & Professional, Glasgow, p. 223-247, 1998.

**LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, S. V.** Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

**LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M. & KRISHNAIAH, M.M.** Scale-up strategies for solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, v.27, p.259-273, 1992.

**LOPES-FILHO, J. F.; FORTES, M.** Condutividade térmica da batata. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.8, n.2, p. 146-154, 1988.

**LOZANO, J. E.; MARTIN, J. U.; TOTSTEIN, E.** Thermal conductivity of apples as a function of moisture content. **Journal of Food Science.** v. 44, p. 198-286, 1979.

**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.

**MAIORANO, A. E.; SCHMIDELL, W.; OGAKI, Y.;** Short Communication: Determination of the enzymatic activity of pectinases from different microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v. 11, p. 355-356, 1995.

**MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R.** Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. **Applied Environ. Microbiol.** V. 57, p. 712-716, 1991.

**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.** v.8, n.7, p. 501-504, May., 1986.

**MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M.; CALLIERI, D. A.;** Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase. **Scienses Des Aliments.** v. 9, p. 101-110, set. 1989.

**MARSH, A. J.; MITCHELL, D. A.; STUART, D. M.; HOWES, T.** O<sub>2</sub> uptake during solid-state fermentation in a rotating drum biorreactor. **Biotechnology Letters,** v. 20, p. 607- 611, 1998.

**MARQUARDT, M. M.; PAVAN, V.; GERMANI, J. C.** Estudos de obtenção de proteases por *Bacillus cereus* em meio de proteína de soja. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Brasília. ANAIS...Brasília, 2002.

**MARTIN, N.; DA SILVA, R.; GOMES, E.** Estudo do tempo de cultivo na produção de pectinases por *Penicillium* sp EGC5 e *Moniella* sp 9SB em fermentação semi-sólida (FSS) de resíduos agrícolas. In: Congresso de Fermentação Semi-sólida, 2003, Florianópolis. ANAIS...Florianópolis, 2003.

**MARTINS, E. S.; SILVA, D.; SILVA, R.; GOMES, E.** Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p.949-954, 2002.

**MARTINS, E.** Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais. São José do Rio Preto, 2003. 154 p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos. **IBILCE-UNESP**, Universidade Estadual Paulista.

**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.

**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.

**MIKHAILOVA, R. V.; SAPUNOVA, L. I.; LOBANOK, A. G.** Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 457-461, 1994.

**MILLER, G.L.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

**MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K.** Definition, Characteristics and Potential, cap I, p. 1-16. In: Doelle, H. W.; Mitchell, D. A.; Rolz, C. E. (ed.) **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

**MITCHELL, D. PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N.** Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**. V. 35, p. 167-178, 1999.

**MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A.** New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**. V. 35, p. 1211-1225, 2000.

**MITIDIERI, S.; SIUMAR, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.** Produção de Protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Brasília. ANAIS...Brasília, 2002.

**MODAK, J. M.; RAJAGOPALAN, S.** Heat and mass transfer simulation studies for solid-state fermentation processes. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.13, p.2187-2193, 1994.

**MOHSENIN, N. N.** Thermal conductivity, diffusivity, and unit surface conductance of foods and agricultural materials. In: **Thermal Properties of Foods**. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1980. P. 122-195.

**MOLDES, D.; COUTO, R. S.; CAMESELLE, C.; SANROMAN, M. A.** Study of the degradation of dyes MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. **Chemosphere**. V. 51, p. 295-303, 2003.

**MOO-YOUNG, M.A., MOREIRA, R., TENDERGY, R.P.** Principles of solid-substrate fermentation. In: SMITH, S.E., BERRY, D.R., VRISTIUNSEN, B. The filamentous fungi. London, 1983. p.117-44.

**MURADO, M. A.; GONZALEZ, M. P.; TORRADO, A., PASTRANA, L. M.** Amylase production by solid state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. **Process Biochemistry**. V. 32, n.1, pg. 35-42, 1997.

**MURR, F. E. X.** Estudo dos fenômenos de secagem de batata. Campinas, 1992. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

**NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R. & TAGUCHI, H.** Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation Technology**. V.60, n.4, p.311-319, 1982.

**OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A.** Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

**ORIOLO, E.; SCHETTINO B.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT M.** Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. **Journal of Fermentation Technology**, Tokio, v. 66, n. 1, p. 57-62, Feb., 1988.

**PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M.** Avaliação de cascas de limão taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: Congresso de Fermentação Semi-sólida, 2003, Florianópolis. ANAIS...Florianópolis, 2003 (a).

**PANAROTTO, C.; VALIM, R.T.O.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M.** Produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em meio semi-sólido com diferentes espessuras. In: Congresso de Fermentação Semi-sólida, 2003, Florianópolis. ANAIS...Florianópolis, 2003 (b).

**PANDEY, A.** Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 26, n. 6, p. 355-366, Dec.,1991.

**PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. V. 77, p. 149 – 162, 1999.

**PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D.** New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**. V. 35, p. 1153 – 1169, 2000.

**PATHAK, N.; SANWAL, G. G.** Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. **Phytochemistry**, v. 48, n 2, p. 249-255, 1998.

**PARK, K. J.; MURR, F. E. X.; SALVADEGO, M.** Medição da condutividade térmica de milho triturado pelo método da sonda. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. V. 17, p. 242-247, 1997.

**PARK, K. J.; MURR, F. E. X.; SALVADEGO, M.** Construção de um sistema de medição da condutividade térmica pelo método da sonda. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. V. 17, p. 7-10, 1997.

**PARK, K. J.; ALONSO, L. F. T.; NUNES, A. S.** Determinação experimental da condutividade térmica de grãos em regime permanente. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. V. 19, p. 264-269, 1999.

**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).

**PHEENTAVEERAT, A.; ANPRUNG, P.** Effect of pectinases, cellulases and amylases on production of banana juice. **Food**. V. 23, p. 188-196, 1993.

**PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G.** Purification and Characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters**. V. 145, p. 295-299, 1996.

**PILNIK, W.; VORAGEN, A. G. J.** Pectic enzymes in fruit juice and vegetable manufacture. In: Reeds, G. (Ed), **Food and Science Technology, Enzymes in Food Processing**. Academic Press, New York, p. 363-399, 1993.

**PITT, J. I.** *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n°2, p. 266-269, 1987.

**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.

**POHLAND, A. E.** Studies concerning the metabolites produced by *Stachybotrys atra*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium viridicatum* and *Aspergillus versicolor*. **Annales de la Nutrition et de L'alimentation**, n°31, p. 663-684, 1977.

**RABALHO, A. A.** Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca. Dissertação apresentada à Unesp, São José do Rio Preto, para obtenção do título de mestre, 2002.

**RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G.** Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. V.13, p. 127-135, 2003.

**RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D.** Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, v. 8, p.263-270, 1981.

**RAIMBAULT, M.** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Process Biotechnology**. 1998.

**RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAGHAVA RAO, K.S.M.S.** Biochemical Engineering Aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v.38, p.99-146, 1993.

**RAMOS, A. J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N.** Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, pag 133-140, 1998.

**REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MRACKOVÁ, M.; LUKNÁR, D.; KOHN, R.** The role of secondary alcoholic groups of D-galacturonan in its degradation by endo-D-galacturonase. **Coll. Czech. Chem. Commum.** V.42, p.3204-3213, 1977 (**Apud**) **NAGODAWITHANA, T.; REED, G. (Eds), Enzymes in food processing.** Academic Press, INC, 3<sup>rd</sup> ed., p. 363-399, 1993.

**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.

**RIZZATTO, M. L.; GOMES, E.; ALEGRE, R. M.** Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado. Campinas, 1999.

**RODRIGUEZ, J. A.; ECHEVARRIA, J., RODRIGUEZ, F. J.; SIERRA, N.; DANIEL, A. & MARTINEZ, O.** Solid state fermentation of dried citrus peel by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. V. 7, n. 8, p. 677-680, 1985.

**RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M.** Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Braz. J. Microbiol.** V.33, n.1, 2002.

**ROBYT, J. F. e WHITE, B. J.** **Biochemical Techniques: Theory and Practice.** Waveland Press, inc., Illinois, 407p., 1990

**ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W.** Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Process Biochemistry**, London, v. 13, n.8, p. 9-13, Aug., 1978.

**ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G., SAUCEDO-CASTANEDA, G., LONSANE, B. K.** Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. **Micol. Neotrop. Apl.**, v. 4, p. 83-9, 1991.

**ROYER, R.** **Modern Experimental Biochemistry.** 3ªed., Ed. Benjamin, Cummings, 475p., 2000.

**SAID, S.; FONSECA, M. J. V.; SIÉSSERE, V.** Pectinase production by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 607-609, 1991.

**SAJC, L.; GRUBISIC, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.** Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. **Biochemical Engineering Journal**. V. 4, p. 89-99, 2000.

**SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y.** Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**. V. 60, p. 153-157, 2001.

**SARAIVA, C. P.; TREICHEL, H.; WENDT, R.; OGRODOWSKY, R.** Estudo de um biorreator tipo tambor rotativo para o enriquecimento proteico do farelo de arroz. **Trabalho de conclusão de curso**, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, Brasil, 1999.

**SATO, K.; NAGATANI, M.; NAKAMURA, K.; SATO, S.** Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid-state culture with forced aeration. **Journal Ferment. Technology**. V. 61, p. 623-629, 1983.

**SATO, K. & SUDO, S.** Small-Scale solid-state fermentation. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Second edition, 1999.

**SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B. K.; NAVARRO, J. M.; ROUSSOS, S. Y. RAIMBAULT, M.** Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. **Applied Microbiology Biotechnology** 37: 580-582, 1992.

**SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E.** Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 234-244, 1997.

**SCHWIMMER, S.** Roler 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.

**SCOPES, R.K.** **Protein Purification- Principles and Practic**. 3.ed. New York: Springer-Verlag, 380 p., 1994.

**SCOTT, P. M.** The natural occurrence of trichothecenes. In Beasley, V.D. (ed), **Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiology Effects**, V. 1 CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-26, 1989 (Apud) D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. **Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

**SHAH, N. K., RAMAMURTHY, V. & KOTHARI, R. M.** Comparative profiles of fungal alpha-amylase production by submerged and surface fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 5, p. 361-364, 1991.

**SHARMA, D. K., THOMPSON, T. L.,** Special heat and thermal condutivity of sorghum. **Transation of the ASAE**, v. 16, n. 01, p. 114-117, 1973.

**SILLEY, P.** The production and properties of a crude pectin lyase from *Lachnospira multiparus*. **Letters in Applied Microbiology**. V. 2, p. 29-31, 1986.

**SILMAN, R. W., CONWAY, H. F., ANDERSON, R. A., BAGLEY, E.B.** Production of aflatoxin in corn by a large-escale solid-substrate fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1799-808, 1979.

**SILMAN, R. W.** Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p. 411- 420, 1980.

**SILVA, D.** Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas. São José do

Rio Preto, 2003. 208 p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos. **IBILCE-UNESP**, Universidade Estadual Paulista.

**SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E.** Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brasilian Journal of Microbiology**. V. 33, p. 318-324, 2002.

**SILVA, M. R. O.; SOUZA, P. M.; MOREIRA, K. A.; SANTIAGO, A. L. C.; CORRÊA, J.; LIMA FILHO, J.; SOUZA-MOTTA, J. L.; PORTO, A. L. F.** Estudo de métodos de extração de proteases termoestável produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis/ SC, 2003.

**SINGH, S. A.; PLATTNER, H.; DIEKMANN, H.** Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 420-425, 1999a.

**SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; APPU RAO, A. G.** Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 411-417, 1999b.

**SMITH, J. E.; ROSS, K.** The toxigenic Aspergilli. In: SMITH, J. E.; ANDERSON, R. A. (Eds.), **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 101-118, 1991 (Apud) Hussein, H. S.; Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

**SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBECK, H. M.; HAGE, J. C.; KAYNAK, A.; KNOL, W.** The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 22, p. 50-57, 1998.

**SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.** Fruit flavor production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee rusk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 857-861, 2000.

**SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; GOMES, E.** Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**. V. 30: 225-230, 1999.

**SOARES, M. M.; DA SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E.** Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extration. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. V.17, p. 79-82, 2001.

**SOARES, V. F.; CASTILHO, L.D.; BOM, E. P. S.; FREIRE, D. M. G.** Produção de protease por *Bacillus subtilis* por fermentação no estado sólido. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis/ SC, 2003.

**SOLÍS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.** Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. **Applied Microbiology Biotechnology**, México, v. 39, p. 36-41. October 1993.

**SOMOGY, M.** Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19, 1952.

**STUART, D. M.; MITCHELL, D. A.; JOHNS, M. R.; LITSTER, J.D.** Solid state fermentation in rotating drum bioreactors: operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. **Biotechnology Bioengineering**. V. 63, p. 383-391, 1999.

**SWEAT, V. E.** Thermal properties of food. In: **RAO, M. A.; RIZVI, S. S. H.** **Engineering Properties of Foods.** New York: Marcel Dekker, Inc, 1986. Cap. 2, p. 49-87.

**TANIWAKI, M. H.; SILVA, N.** Fungos deterioradores de alimentos ocorrência e detecção. **ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.** P. 75, 1996.

**TARAGANO, V. M.; PILOSOF, A. M. R.** Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology.** V. 25, p. 411-419, 1999.

**TEIXEIRA, M. F. S.; FILHO, J. L. L., DURAN, N.** Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 31, p. 286-290, 2000.

**TENDERGY, R.P.** Solid state fermentation. **Trends in Biothecnology,** v.3, n.4, p.96-9.1985.

**TERZI, S. C.; CARVALHO, C. V. P.; OLIVEIRA, A. C. P.; COURI, S.** Influência da variação da concentração de inóculo do *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção da enzima poligalacturonase. In: Congresso de Fermentação Semi-sólida, 2003, Florianópolis. ANAIS...Florianópolis, 2003.

**THIEMANN, J.E.** Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referências às celulases. In: SEMINÁRIO DE "HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS", 2, 1985, Maringá. Anais...Maringá, 1985. p.1077-31.

**TOCCHINI, R. P.; LARA, J. C.C.** IndustrializaÇão de suco de banana simples e concentrado. **Boletim Ital.** V. 51: 93-112, 1977.

**TOKUYOSHI, K.; SILVA, D.; RIZZATTO, M. L.; DA SILVA, R.; GOMES, E.** Produção de pectinases por *Curvullaria inaequalis* atavés da variação de umidade, tempo e biorreator durante a fermentação em estado sólido de farelo de trigo e bagaço de laranja. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Brasília. ANAIS...Brasília, 2002.

**TONG, C; DRAUGHON, F. A.** Inhibition by antimicrobial food additives of Ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 49, n°6, p. 1407-1411, 1985.

**TOYAMA, N.** Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. **Biothechnology and Bioeng. Symp.**, n.6, p. 207-19, 1976.

**VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.** Degradation of ochratoxin A by *Apergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.

**VIQUEZ, F.; LASTRETO, C.; COOKE, R. D.** A study of the production of clarified banana juice using pectinplytic enzymes. **J. Food technology.** V.16: 115-125, 1981.

**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.

**WOGAN, G. N.** Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. **Bacteriology Review**, v. 2, p. 460-470, 1966.

WOOD, P. J.; SIDDIQUI, I. R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 39, p. 418-428, 1971.

WORD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56, p. 445-462, 1993a.

WORD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisins B1 and B2 and fusarin C. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56, p. 445-462, 1993b.

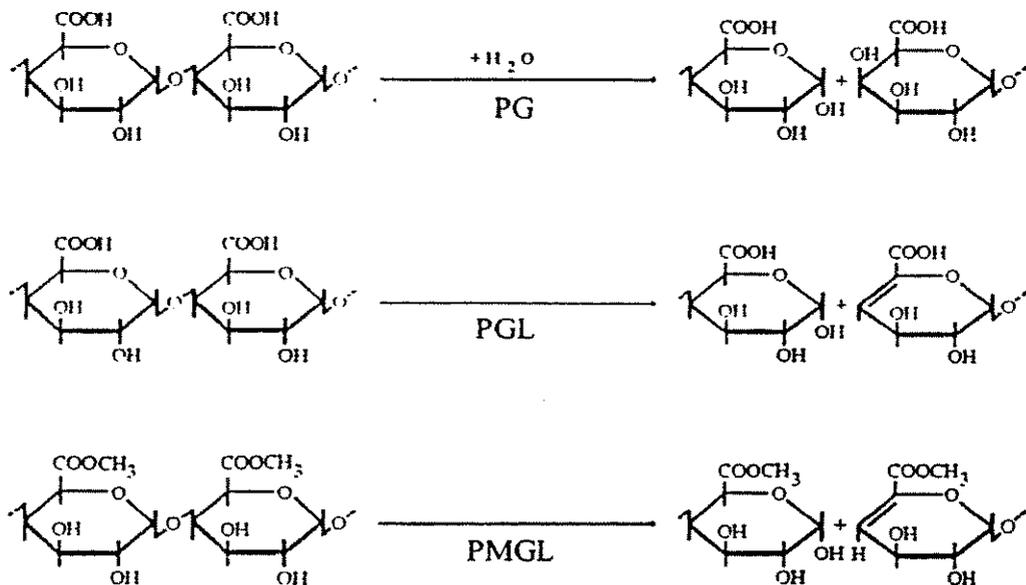
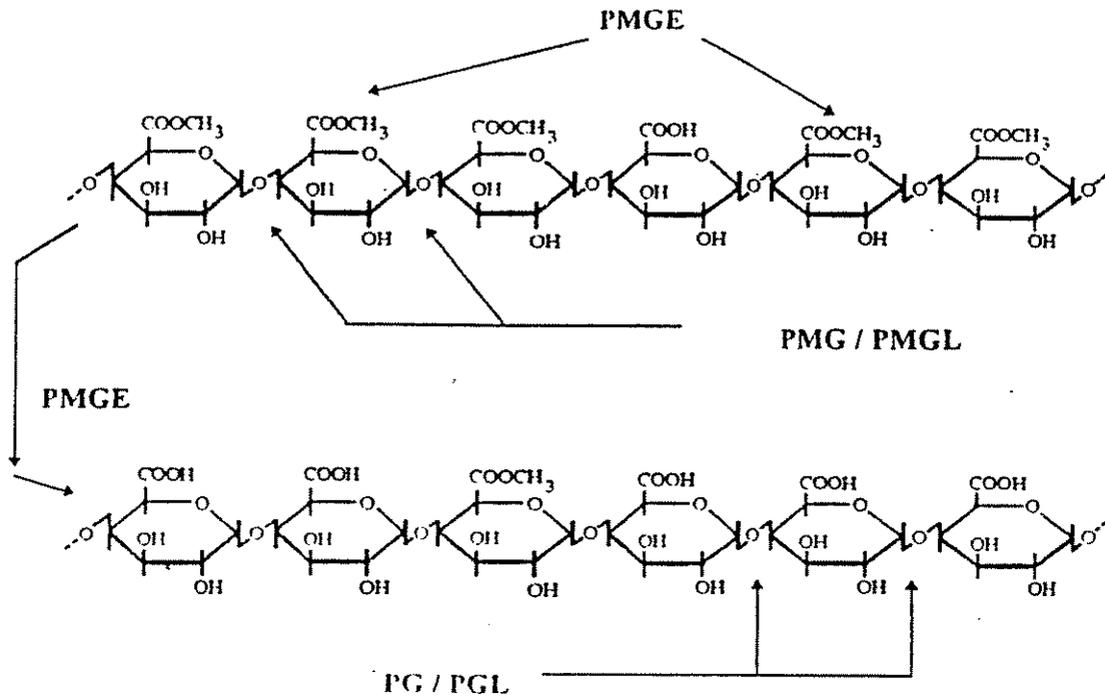
YAO, C.; CONWAY, W. S.; SAMS, C. E. Purification and Characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. **Biochemistry and Cell Biology**. V.86, p. 1160-1166, 1996.

YU, T. H.; WU, C. M. Production of clarified banana juice using pectinolytic enzymes. **Food Science**. v. 14, p. 154-164, 1987.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 825-830, 2000.

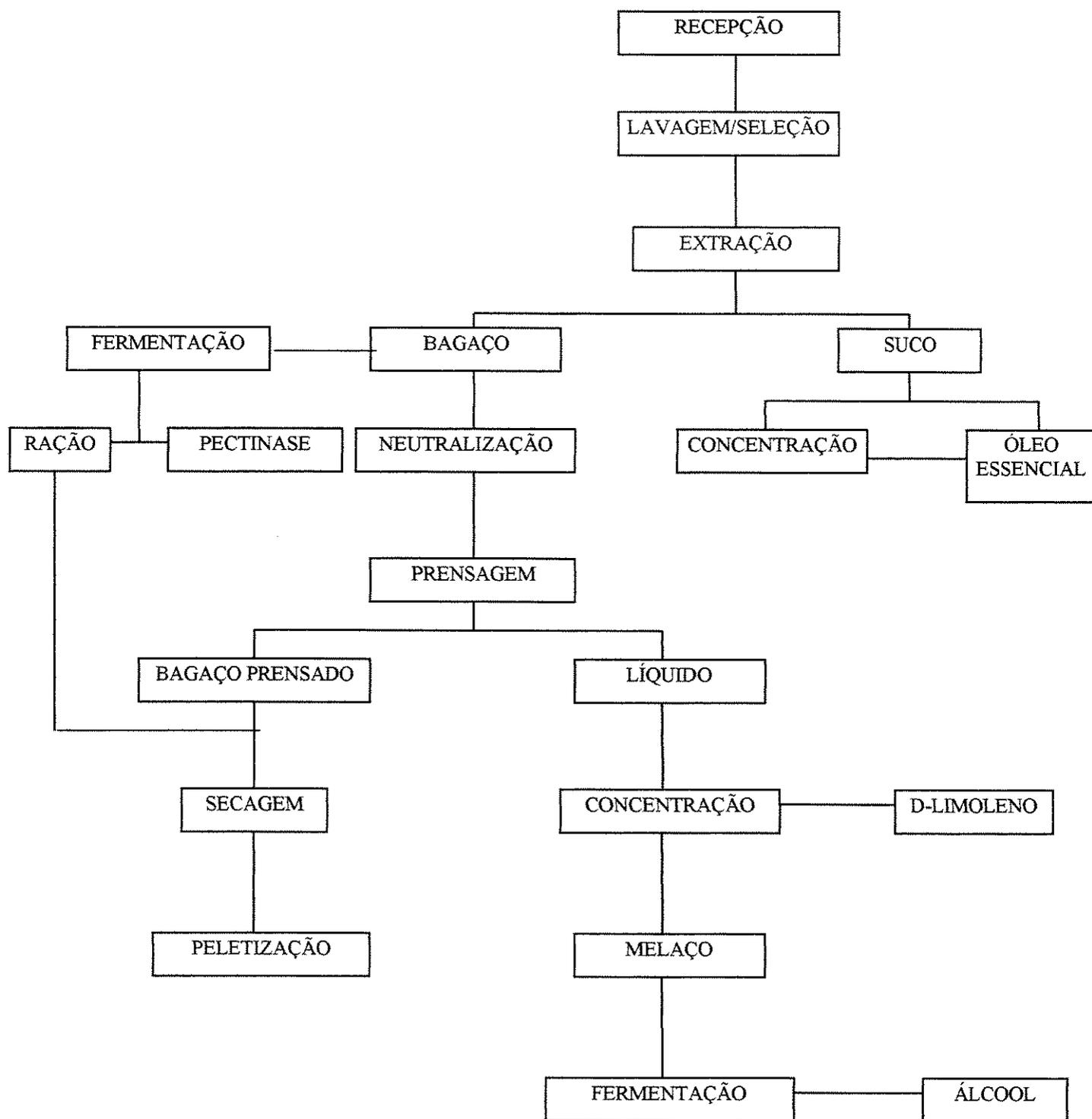
XIX - ANEXOS

ANEXO A - Ação das enzimas pectinolíticas.



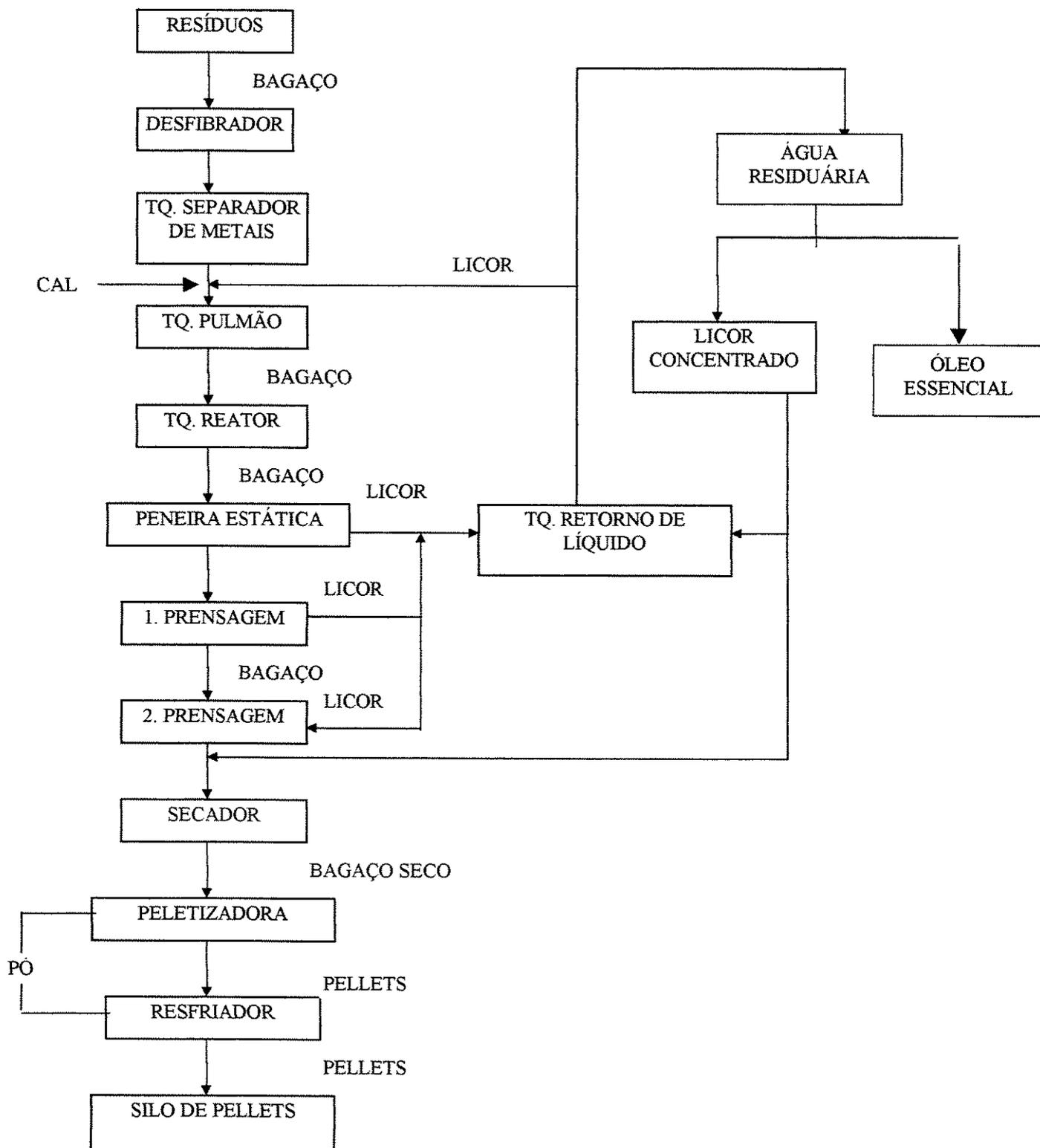
( Fonte : SCHWIMMER, 1981)

**ANEXO B - Fluxograma do processamento de suco de laranja concentrado, modificado para a produção de enzimas pectinolíticas e ração animal**



(Fonte: MENEZES, 1989)

**ANEXO C - Fluxograma da fabricação de pellets**



(Fonte: CAVENAGHI, 1995)

**ANEXO D: Dados experimentais tabelados, empregados na construção dos gráficos apresentados**

**TABELA B1** : Hidrólise de pectina por pectinases de *P. italicum* IZ 1584 para estudo do tempo de reação enzimática.

Tempo (minutos)	Exo-Pg (U/g)	Endo-PG (U/g)	Pectinaliase (U/g)
10	8,7	58	3200
15	9,5	69	4980
20	14	73	5074
30	14,5	73	5074,5
45	14	73	5074
60	14	74	5074

**TABELA B2** : Atividade de pectinases em embalagens de polipropileno.

Tempo (dia)	Exo-PG (U/g)	Endo-PG(U/g)	Pectinaliase (U/g)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	9,2	0
4	0	14,8	718
5	0.48	25,6	1222
6	0.85	65,6	2040
7	0.87	74,4	2540
8	1.1	72,8	4600
9	1.92	70,4	4840
10	3.45	60,4	4820
11	5.5	60,1	5560
12	7.4		5660
13	8.3		
14	12.4		
15	14.39		
16	15		
17	14.7		
18	12.8		

**TABELA B3** : Açúcares Redutores Totais (ART) e pH da fermentação em embalagens de polipropileno.

Tempo (dia)	ART	PH
1	0.19	4.5
2	0.16	4.5
3	0.14	4.46
4	0.13	4.45
5	0.127	4.53
6	0.126	4.58
7	0.126	4.72
8	0.019	5.05
9	0.017	5.52
10	0.015	5.75
11	0.013	6.0
12	0.013	6.2
13	0.012	6.5
14	0.01	6.75
15	0.001	6.8
16	0.001	7.0
17	0.0009	7.4
18	0.0008	7.6

**TABELA B4** : Atividade de Exo-PG em reator de coluna em meios com diferentes umidades.

Tempo (dia)	50% umidade	55% umidade	60% umidade
1	0	11,2	15
2	0	23,1	37,4
3	0	27,4	74,8
4	6,2	30,17	90
5	8,4	74,75	104,8
6	12,4	86,7	154,4
7	18,1	92,3	149,2
8	22,85	108,2	132,6
9	48,7	115,4	118,4
10	59,3	118,2	102,5
11	72,5	150,4	95,2
12	93,4	115	90,7
13	119,2	109	72,1
14	101	84	65,8
15	74,8	68,35	55

**TABELA B5** : Atividade de Endo-PG em reator de coluna em meios com diferentes umidades.

<b>Tempo (dia)</b>	<b>50% umidade</b>	<b>55% umidade</b>	<b>60% umidade</b>
1	324	332	393
2	406	492	404
3	438	570	567
4	496	645	695
5	527	780	787
6	603	694	762
7	728	685	688
8	706	541	648
9	632	452	529
10	598	400	409
11	583		398

**TABELA B6** : Atividade de pectinaliase em reator de coluna em meios com diferentes umidades.

<b>Tempo (dia)</b>	<b>50% umidade</b>	<b>55% umidade</b>	<b>60% umidade</b>
1	0	0	0
2	0	10980	11340
3	1971	12430	17309
4	2546	19335	18972
5	6109	20174	23418
6	11029	22232	23818
7	12182	23927	22590
8	14764	23758	20284
9	14598	18370	18122
10	10128	17927	18073
11	8654	17562	18054

**TABELA B7** : Atividade de Exo-PG em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.

Tempo (dia)	Sem aeração	5 L/h	10 L/h	15 L/h	20 L/h	25 L/h	30 L/h
1	0	15,2	35	38	43	52	63
2	0	33,5	83,4	85	81,1	88	120
3	0	88,4	92	102	104	152	160
4	2,7	101,2	112	137,5	180	170	172
5	7	152	188	231,4	223	249	260
6	8,5	153	226	259	258	262	218
7	8,8	150	261	245	182	241	208
8	9,02	122	254	192	174	194	201
9	9,3	98	212	168	159	173	174
10	14,4	95	170	163	155	169	173
11	20,01	83	165	159	149	155	167
12	25,4	81	142	158	143	152	165
12	25,4	81	142	158	143	152	165
13	28,2	72,4	140	148	143	151	165
14	32,3						
5							

**TABELA B8** : Atividade de Endo-PG em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.

Tempo (dia)	Sem aeração	5 L/h	10 L/h	15 L/h	20 L/h	25 L/h	30 L/h
1	0	315	408	451	536	542	544
2	161	463	440	528	542	560	560
3	173	526	608	652	544	688	687
4	240	672	636	670	687	700	705
5	248	720	640	733	736	735	714
6	249	734	681	747	732	700	728
7	248	742	667	690	644	607	701
8	231	675	642	585	629	594	649
9	228	549	594	569	532	525	548
10	175	496	376	508	521	511	529
11	173	478	368	504	502	503	509

**TABELA B9** : Atividade de pectinaliase em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.

Tempo (dia)	Sem aeração	5 L/h	10 L/h	15 L/h	20 L/h	25 L/h	30 L/h
1	0	0	0	1128	12980	11580	11970
2	0	0	4210	1845	15100	13564	12749
3	0	1142	5855	5980	16262	19164	19141
4	0	2320	6126	6618	17022	21043	20208
5	608	2545	6980	7636	18035	23894	22980
6	1509	8970	7127	13748	23912	22180	20360
7	2545	13263	13721	23882	22114	19280	19770
8	5980	13121	23870	22640	16800	17291	17309
9	8720	10430	17782	21012	15709	17040	16291
10	8090	6109	15980	18655	15112	16112	15980
11	6582	6001	15273	18541	14980	15940	14108
12	5564	4582	15270	18538	12218	14108	13987
13	4223	4320	15128	18422	12109	14100	13972

**TABELA B10** : Açúcares Redutores Totais (ART) da fermentação em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.

Tempo (dia)	Sem aeração	5 L/h	10 L/h	15 L/h	20 L/h	25 L/h	30 L/h	
1	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
2	0,19	0,15	0,17	0,17	0,12	0,12	0,13	0,112
3	0,17	0,12	0,13	0,13	0,1	0,1	0,1	0,1
4	0,16	0,1	0,11	0,1	0,1	0,09	0,1	0,1
5	0,15	0,1	0,1	0,09	0,09	0,01	0,009	0,009
6	0,15	0,09	0,09	0,09	0,09	0,01	0,009	0,009
7	0,14	0,08	0,072	0,01	0,009	0,009	0,009	0,007
8	0,11	0,06	0,03	0,009	0,009	0,009	0,009	0,007
9	0,11	0,05	0,0027	0,007	0,007	0,006	0,007	0,006
10	0,09	0,05	9E-4	0,007	0,007	9E-4	1E-4	9E-4
11	0,06	0,009	1E-4	0,007	1E-3	1E-4	1E-4	1E-4
12	0,05	0,009	9E-4	1E-3	1E-3	1E-4	1E-4	1E-4
13	0,05	0,009	1E-4	1E-3	1E-3	1E-4	1E-4	1E-4

**TABELA B11** : pH da fermentação em reator de coluna com diferentes taxas de aeração.

Tempo (dia)	Sem aeração	5 L/h	10 L/h	15 L/h	20 L/h	25 L/h	30 L/h
1	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
2	4,54	4,6	4,8	4,9	4,9	5	5,2
3	4,77	5,02	5,3	5,02	5,2	5,5	5,6
4	4,92	5,3	5,67	5,7	5,5	5,7	5,9
5	5,01	5,7	6	6,3	6,4	6,2	6,7
6	5,25	5,99	6,2	6,4	6,7	6,7	6,9
7	5,8	6,2	6,6	7,2	7,4	7,4	7,6
8	5,92	6,4	6,92	7,5	7,6	8	8
9	6,02	6,9	7,1	7,8	7,9	8,2	8,32
10	6,1	7,2	7,5	7,99	8	8,28	8,39
11	6,12	7,6	7,9	8,19	8,19	8,3	8,4
12	6,23	8	8	8,22	8,3	8,39	8,45
13	6,44	8,01	8,2	8,23	8,37	8,44	8,45

**TABELA B12** : Efeito da densidade aparente do meio sobre a atividade de exo-PG ao longo do processo fermentativo.

dias	$d_{ap}=430$ g/L	$d_{ap}=522$ g/L	$d_{ap}=570$ g/L	$d_{ap}=665$ g/L	$d_{ap}=760$ g/L
1	0	0	0	0	0
2	32	22	18	12	9
3	79	69	59	21	18
4	135	125	103	54	39
5	234	211	147	75	105
6	264	256	197	192	172
7	245	223	247	204	178
8	190	199	236	168	164

**TABELA B13** : Efeito da densidade aparente do meio sobre a atividade de endo-PG ao longo do processo fermentativo.

dias	$d_{ap}=430$ g/L	$d_{ap}=522$ g/L	$d_{ap}=570$ g/L	$d_{ap}=665$ g/L	$d_{ap}=760$ g/L
1	0	0	0	0	0
2	522	234	193	180	94
3	599	480	370	197	112
4	649	531	398	231	122
5	738	583	432	257	138
6	692	603	481	296	151
7	631	699	505	340	177
8	543	630	477	321	164

**TABELA B14** : Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação sem aeração ( $d_{ap}=430g/L$ ).

horas	h=0mm	H=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,8	27,4	27,5	27,7	28,2	27,2
6	28,4	28,3	28,4	27,9	28,4	28,2
12	28,8	28,5	28,8	28	28,5	28,3
24	28,9	29	28,9	28,1	29,1	28,5
50	29,1	29,2	29,1	28,5	29,3	28,7
58	29,3	29,5	29,3	28,3	29,4	28,9
63	29,7	29,8	29,7	28,4	29,5	29,3
69	29,8	29,8	29,8	28,5	29,9	29,7
74	29,9	29,9	29,9	28,8	30	29,9
122	30,4	30,1	30,4	28,9	31,5	30,5
183	30,3	30,2	32,5	29,1	31,8	31,1
215	30,6	31,4	33,6	29,3	34,3	31,8
234	31,1	32,6	36,1	29,2	35,7	32,1
288	32	35,2	37,2	27,9	36,3	32,3
294	31,8	35	35,8	28,1	36,1	32,7
300	29	31,4	34	28,1	33,7	32,9

**TABELA B15** : Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração ( $d_{ap} = 430g/L$ ).

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,8	27,4	27,5	27,7	28,2	27,2
6	28,4	28,6	28	28,2	29	28,2
12	28,6	28,7	28,2	28,4	29,1	28,3
24	28,4	28,8	28,4	28,6	29,2	28,5
50	28,7	29	29,1	28	29,5	28,7
58	29,1	29,1	29,5	28,6	29,7	28,9
63	29,5	29,5	30,1	28,8	30	29,3
69	30,6	29,7	30,7	28,4	30,5	29,7
74	31	30,2	31,2	28,1	30,8	29,9
96	31,5	30,6	31,5	28	31,2	30,5
111	31,9	31,1	31,8	28,3	31,5	31,1
122	31,4	31,6	32	28,2	31,3	31,8
132	30,6	31,8	32,4	28,2	30,8	31,5
144	30,2	31,9	30,6	27,9	30,5	31,3
152	30	31,9	29,7	28,1	30,5	30,5
160	29,8	31,4	29	28,1	30,4	30,5

**TABELA B16** : Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 522g/L) .

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,8	27,4	27,5	27,7	28,2	27,2
6	28	28,6	28	27,8	28,2	28,2
12	28,2	28,7	28,2	28	28,4	28,3
24	28,7	28,8	28,4	28,1	28,6	28,5
50	28,8	29	29,1	28,2	28	28,7
58	28,9	29,1	29,5	28,2	28,6	28,9
63	29,1	29,5	30,1	28,1	28,8	29,3
69	29	29,7	30,7	28	28,4	29,7
74	29,2	29,7	31,2	28,3	30,5	29,9
96	29,2	29,8	31,5	28,3	31,9	30,5
111	29,5	30,1	33	28,5	32,6	31,1
122	29,7	30,6	33,5	28,5	32,8	31,8
132	29,8	30,8	33,7	28,5	32,1	31,5
144	29,9	30,7	34	28,7	31	31,3
152	30	29,2	33,7	28,7	30,1	30,5
160	29,8	28,9	33	28,6	30	30,5

**TABELA B17** : Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 570g/L).

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,8	27,4	27,5	27,7	28,2	27,2
6	28	28,6	28	27,8	28,2	28,2
12	28,2	28,7	28,2	28	28,4	28,3
24	28,7	28,8	28,4	28,1	28,6	28,5
50	28,8	29,2	29,1	28,2	28	28,7
58	28,9	29,1	29,5	28,2	28,6	28,8
63	29,1	29,3	30,1	28,1	28,8	29,3
69	29,2	29,7	31,7	28	28,4	29,7
74	29,8	30,5	31,8	28,3	30,5	29,7
96	30,5	30,8	32,5	28,3	31,9	30,5
111	30,7	31,8	33,5	28,5	32,6	31,1
122	31,3	32,4	33,8	28,5	32,8	31,8
132	31,4	33,2	34,5	29,1	33,5	32,5
144	31,2	33,5	34,8	28,7	32,4	32,1
152	30	33,1	34,7	28,7	32,1	32
160	29,8	32,8	34,1	28,6	31,8	31,8

**TABELA B18** : Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 665g/L) .

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,8	27,4	27,5	27,7	28,2	27,2
6	28	28,6	28	27,8	28,8	28,2
12	28,3	28,7	28,2	28,2	29,4	28,7
24	28,7	28,8	29,8	28,1	29,4	29
50	29,9	29,8	30,6	28,2	30	29,8
58	30,5	30	30,7	28,2	31,8	30,8
63	30,5	30,4	32,1	28,4	32,6	30,9
69	30,9	30,7	32,8	28,4	33,2	31,7
74	31,2	31,5	34,4	28,5	33,6	32,7
96	31,8	32,7	35	28,3	33,8	32,8
111	32,6	33,5	35,1	28,8	34,7	33,8
122	32,8	33,8	35,4	28,8	34,7	34
132	33,5	34,2	36	29,5	35	34,7
144	33,8	35,2	36,2	29,9	35,1	34,7
152	33,5	33,1	35,9	29,7	35,1	34,5
160	33,1	32,8	35,4	29,5	34,8	34,3

**TABELA B19** : Perfis de temperatura das diversas alturas (h) em função do tempo de fermentação com aeração (dap = 760g/L) .

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,8	27,4	27,5	27,7	28,2	27,2
6	28,7	28,6	29,1	28	28,8	28,2
12	29,6	29,7	30,1	28,2	29,6	28,7
24	29,7	29,9	30,5	28,1	30,1	29,8
50	30,4	30,8	31,4	28,2	32	30
58	30,5	31,1	32,1	28,3	33,7	31,5
63	31,5	31,4	33,1	28,4	34,8	31,8
69	31,5	31,7	33,3	28,8	35,1	32,1
74	32,2	32,5	34,4	28,9	36	33,9
96	32,5	33,7	36,5	29	36,5	34,8
111	32,6	35,6	36,8	29,3	36,8	35,4
122	33,9	35,8	37,2	29,3	37,2	36,3
132	34,5	36,2	37,5	29,9	37,2	36,7
144	34,8	36,5	37,4	30,1	37	36,5
152	34,1	33,1	37	29,7	36,8	36,3
160	34,1	32,8	36,5	29,5	36,4	36,2

**TABELA B20:** Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido utilizando material inerte como substrato (dap = 430g/L).

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,9	27,3	27,5	27,7	27,2	27,2
6	28	27,9	28	27,8	27,8	27,5
12	28,1	28,5	28,2	27,8	28,5	27,8
24	28,2	28,5	28,4	27,9	28,5	28
50	28,2	28,7	28,9	28,1	28,6	28,2
58	28,5	29	29	28,2	28,6	28,5
63	28,7	29,1	29	28,8	28,5	28,9
69	29	29,1	29,5	28,4	29	29
74	29,9	29,5	30,2	28,1	29,5	29,1
96	30,9	29,5	30,9	28	30,1	30,3
111	31	30,1	31,5	28,3	30,5	30,9
122	30,5	30,9	31,5	28,2	30,7	30,9
132	29,8	31,5	31,7	28,2	29,5	30,5
144	29	31,5	29	27,9	29	29,8
152	28,4	30,4	28,8	28,1	29,5	29,5
160	28,1	29,9	28,1	28,1	29	29,4

**TABELA B21:** Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido utilizando material inerte como substrato (dap = 522g/L).

horas	h=0mm	h=70mm	h=140mm (centro)	h=140mm (parede)	h=210mm	h=280mm
1	27,2	27,2	27,3	27,7	27,8	27,2
6	27,5	28,6	27,8	27,8	28	28,2
12	27,8	28,7	28,5	28	28,3	28,3
24	28	28,8	28,8	28,1	28,4	28,5
50	28,2	29	28,8	28,2	28,5	28,7
58	28,3	29,1	29	28,2	28,5	28,9
63	28,3	29,5	29,5	28,1	28,8	29,3
69	28,5	29,7	29,9	28	30	29,7
74	28,5	29,7	30	28,3	31,3	29,9
96	28,7	29,8	30,4	28,3	31,7	29,9
111	28,7	30,1	31,5	28,5	31,8	30,5
122	29	30,6	31,8	28,5	31,9	31,5
132	29,1	30,8	32	28,5	31,5	31,3
144	29,5	30,7	32,3	28,7	30,4	30,8
152	29,5	29,2	31	28,7	29,5	30,5
160	29,1	28,9	31,5	28,6	29	29,7

**TABELA B22:** Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 430g/L).

Dias	sem substrato inerte	com substrato inerte
1	0	0
2	32	40
3	79	83
4	135	169
5	234	267
6	264	254
7	245	231
8	190	195

**TABELA B23:** Atividade enzimática de exo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 522g/L).

Dias	sem substrato inerte	com substrato inerte
1	0	0
2	22	51
3	69	129
4	125	221
5	211	259
6	256	221
7	223	201
8	199	172

**TABELA B24:** Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 430g/L).

Dias	sem substrato inerte	com substrato inerte
1	0	0
2	522	540
3	599	609
4	649	684
5	738	745
6	692	723
7	631	674
8	543	598

**TABELA B25:** Atividade enzimática de endo-PG dos meios de fermentação com e sem material inerte (dap = 522g/L).

Dias	sem substrato inerte	com substrato inerte
1	0	0
2	234	388
3	480	582
4	531	630
5	583	729
6	603	702
7	699	695
8	630	574

**TABELA B26:** Efeito do pH sobre a atividade da enzima exo.

PH	acetato	Citrato-fosfato	Tris-HCl	Glicina-NaOH
3,5	7			
4	8,2			
4,5	8,6			
5	11,2			
5,5	14,4			
5,5	--	13,9		
6	--	11,6		
6,5	--	11,2		
7	--	10,8		
7		--	10,4	
7,5		--	9,8	
8		--	7,8	
8,5		--	7,2	
8,5			--	5
9			--	0
9,5			--	0
10			--	0
10,5			--	0

**TABELA B27** Efeito do pH sobre a atividade da enzima pectinase.

PH	acetato	Citrato-fosfato	Tris-HCl	Glicina-NaOH
3,5	0			
4	0			
4,5	0			
5	0			
5,5	0			
5,5	--	0		
6		0		
6,5		320		
7		1380		
7		--	1400	
7,5		--	2200	
8			3200	
8,5			6800	
8,5				6797
9				4600
9,5				3200
10				2792
10,5				2020
11				2020

**TABELA B28:** Efeito do pH sobre a atividade da enzima endo.

<b>PH</b>	<b>acetato</b>	<b>Citrato-fosfato</b>
5	48	
6	54	
7	68	
7		69
8		67
9		64

**TABELA B29:** Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima exo-PG.

<b>T (°C)</b>	<b>Exo-PG</b>	<b>Endo-PG</b>	<b>pectinaliase</b>
35	12,6	54	5740
40	14,7	63	6213
45	13,6	69	6420
50	10,4	73	6770
55	9,8	65	6332
60	9,3	59	5312
65	9	54	5104

**TABELA B30:** Estabilidade das enzimas frente às variações de pH.

<b>PH</b>	<b>Exo-PG</b>	<b>Endo-PG</b>	<b>pectinaliase</b>
3,5	3,1	43	4980
4	4,3	45	5150
4,5	9,6	52	5240
5	11,3	63	5300
5,5	14,1	69	5500
6	15,1	74	6660
6,5	14,6	72,1	6790
7	13,8	70	6640
7,5	12,2	64	6150
8	10	52	6090
8,5	9,8	49	6010
9	7,3	43	5700
9,5	5,4	38	5690
10	4,3	25	5540
10,5	4,1	23	5530
11	3,4	20,4	5490

**TABELA B31:** Estabilidade das enzimas frente às variações de temperatura.

T (°C)	Exo-PG	Endo-PG	pectinaliase
7	14,3	73	6310
25	14,39	73,2	6420
35	14,8	74	6700
40	15	74,2	6800
45	15,01	74	6780
50	14,6	51	6600
55	13	45	6002
60	10,3	32	5003
65	9,2	25	4001

**TABELA B32:** Efeito do pH sobre a atividade da enzima fracionada exo-PG.

PH	acetato	Citrato-fosfato	Tris-HCl	Glicina-NaOH
3,5	5,6			
4	7,4			
4,5	8,3			
5	11,4			
5,5	12,8			
5,5	--	10,3		
6	--	10,1		
6,5	--	9,3		
7	--	5,2		
7		--	4,8	
7,5		--	4,5	
8		--	3,8	
8,5		--	4	
8,5			--	4,3
9			--	3,7
9,5			--	3,7
10			--	2,8
10,5			--	2,5

**TABELA B33:** Efeito do pH sobre a atividade da enzima fracionada endo-PG.

PH	acetato	Citrato-fosfato	Tris-HCl
5	16,1		
5,5	16,7		
5,5		22	
6		30,3	
6,5		31,4	
7		33,1	
7			29,8
7,5			27,3
8			26

**TABELA B34:** Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima fracionada exo-PG.

T (°C)	Exo-PG	Endo-PG
7	8,3	22,1
25	8,8	24,3
35	9,2	24,6
40	11,9	26,7
45	9,7	28,2
50	9,3	28,5
55	7,9	31,1
60	5,4	25,2
65	3,2	21,3

**TABELA B35:** Estabilidade das enzimas frente às variações de pH (exo-PG).

PH	acetato	Citrato-fosfato	Tris-HCl	Glicina-NaOH
3,5	30,1			
4	40,7			
4,5	44,5			
5	66,3			
5,5	73,3			
5,5	--	88,1		
6	--	90,1		
6,5	--	100		
7	--	92		
7		--	85,1	
7,5		--	60,4	
8		--	50,5	
8,5		--	19,4	
8,5			--	0
9			--	0
9,5			--	0
10			--	0
10,5			--	0

**TABELA B36:** Estabilidade das enzimas frente às variações de pH (endo-PG).

<b>PH</b>	<b>acetato</b>	<b>Citrato-fosfato</b>	<b>Tris-HCl</b>	<b>Glicina-NaOH</b>
3,5	44,3			
4	56,4			
4,5	63,4			
5	66,3			
5,5	68,9			
5,5	--	74,3		
6	--	80,6		
6,5	--	81		
7	--	92,5		
7			100	
7,5			77,3	
8			70,3	
8,5			66,7	
8,5			--	66
9			--	67
9,5			--	63,7
10			--	62,3
10,5			--	62

**TABELA B37:** Estabilidade das enzimas frente às variações de temperatura de exo e endo-PG.

<b>T (°C)</b>	<b>Exo-PG</b>	<b>Endo-PG</b>
7	77,5	44
30	72,4	57
35	85	84
40	100	100
45	82,6	87,7
50	64,3	61
55	0	48
60	0	44
65	0	23,8
70	0	12