



UNICAMP

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

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA EM BAGAÇO DE LARANJA INDUSTRIALIZADO

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Márcia Luzia Rizzatto, aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de agosto de 1999.

Campinas, 25 de agosto de 1999

Prof. Dr. Ranulfo M. Alegre
Presidente da Banca

Autora: MÁRCIA LUZIA RIZZATTO

Orientador: RANULFO MONTE ALEGRE

Dissertação a ser apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS-SP

1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/39092	
PROG. 229199	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 21/10/99	
N.º CPD	

CM-00136285-0

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

R529e Rizzato, Márcia Luzia
Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum*
IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação
Semi-sólida em bagaço / Márcia Luzia Rizzato.- Campinas,
SP: [s.n.], 1999.

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

I.Pectinase. 2.Penicillium italicum. 3.Aspergillus niger.
4. Bagaço. 5.Laranja.I.Alegre, Ranulfo Monte.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos.III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - Orientador



Profa. Dra. Deise Maria Fontana Capalbo - Membro

Prof. Dr. José Miguel Muller - Membro



Profa. Dra. Eleni Gomes - Suplente

Campinas,..... dede 1999.

Ter um ideal e aceitar sofrer por ele.

Evitar as pequenas capitulações cotidianas que preparam as grandes.

Saber exatamente o que se quer e de onde se parte.

Não superestimar as próprias capacidades, mas também não as subestimar.

Persuadir-se de que tudo está por fazer, quando nos dizem "que não há nada a fazer".

Aprender a trabalhar em equipe, sem exclusividade.

Não confundir nervosismo com rapidez.

Ter paciência para esperar.

Saber hoje perder tempo, para estudar algo que servirá amanhã.

Fazer "muito bem" o que se tem a fazer.

Raymond Gillet

Aos meus pais Mário e Jocylla,

Aos meus sogros João e Martha,

Por compartilharem os meus ideais e os alimentarem,

e que jamais poderei ser suficientemente grata...

*Ao Ed, meu companheiro de todos os momentos, pelo
amor, carinho, paciência e por me dar forças para
vencer...*

*As minhas filhas Carolina e Camila, que foram o
maior estímulo para a realização deste trabalho...*

Agradecimentos

À Deus, pela iluminação e presença constante em minha vida.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que me proporcionou conhecimento e crescimento profissional.

À Universidade Estadual Paulista (BIOCE-UNESP), pela permissão para uso da biblioteca, do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada e demais dependências.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela orientação, confiança e incentivo durante este trabalho.

À Prof. Dra. Eleni Gomes, pela amizade, pelas idéias, orientação, paciência e principalmente pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva e Prof. Dra. Célia M. L. Franco, pela força, oportunidade e confiança profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), pelo apoio financeiro na compra dos equipamentos usados na realização deste trabalho.

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

Ao Departamento de Engenharia Agrícola (UNICAMP), pela utilização do moinho.

Aos amigos de coração Denise, Jean e Caco, pelo companheirismo, força, pelos almoços regados a muita risada e principalmente pela amizade verdadeira.

À Mara "nequinha" e Alline, pelos momentos de descontração...

À minha "amigona" Tânia pela força e pelo cantinho quentinho que tantas vezes me acolheu nas noites frias de Campinas.

À Katita, pelo apoio, amizade, ensinamentos e pelo companheirismo nas horas de dificuldade.

Aos grandes amigos de turma... Flávio, Mauro, Alfredo, Mari, Gustavo, André, Janaina, Daniela, Rogério, Marília, Kity, Lèlegal... vocês foram importantes no meu crescimento profissional e pessoal...

À Lia, pelo ombro amigo que me deixou "chorar" bastante...

À Fernanda, pelos bons momentos... saudades!!!!

À Marish e Fábria pela amizade especial...

Aos mais que colegas de laboratório, Tati, Heloíza, Márcia, Daniela, Silvío, Marcela, Fabiana, Ceci, Denis, Eduardo... obrigada pelo ambiente saudável, ensinamentos, dicas, pelos churrascos...e principalmente pelo carinho e amizade...

À Val, pela amizade, paciência e o carinho nas eternas dúvidas de laboratório...

À todos que estenderam as mãos, que repartiram seus conhecimentos e que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho... Muito obrigada !!!!!

Márcia

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Fermentação.....	6
2.1.1. Fermentação Submersa.....	6
2.1.2. Fermentação em meio semi-sólido.....	7
2.2. Reatores para fermentação semi-sólida.....	10
2.3. Controles do processo.....	15
2.4. Substâncias pécticas.....	18
2.4.1. Enzimas pectinolíticas.....	20
2.4.2.1. Pectinaesterase (PMGE).....	20
2.4.2.2. Polimetilgalacturonase (PMG).....	21
2.4.2.3. Poligalacturonase (PG).....	21
2.4.2.4. Polimetilgalacturonato liase (PMGL).....	22
2.4.2.5. Poligalacturonato liase (PGL).....	22
2.4.2. Produção de enzimas pectinolíticas.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Substrato para cultivo de fungos.....	29

3.2. Preparo do substrato.....	29
3.2.1. Moagem do bagaço de laranja.....	29
3.2.2. Lavagem e secagem.....	29
3.3. Caracterização do substrato.....	30
3.3.1. Granulometria.....	30
3.3.2. Umidade.....	30
3.3.3. Determinação do pH do bagaço de laranja e das amostras dos meios fermentados.....	31
3.4. Determinação de Açúcares redutores (Método de Somogy- Nelson).....	31
3.4.1. Preparo dos reagentes.....	31
3.4.2. Dosagem de açúcares.....	32
3.5. Microrganismos.....	32
3.6. Inóculo.....	32
3.7. Contagem de esporos e inoculação.....	33
3.8. Meios de Cultura.....	33
3.9. Sistema de fermentação.....	33
3.9.1. SSF em embalagens de polipropileno	33
3.10. Extração da enzima.....	35
3.11. Estudo do tempo de reação enzimática.....	36
3.12. Determinação das atividades enzimáticas.....	36
3.13. Determinação da produtividade.....	37
3.14. Determinação de açúcares redutores totais no extrato enzimático.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Caracterização do substrato da SSF.....	38
4.1.1. Granulometria do bagaço lavado e não lavado.....	38
4.1.2. Valores de pH, teores de umidade e ART.....	39
4.1.3. Estudo do tempo de reação enzimática.....	39
4.2. Fermentação em meio semi-sólido em embalagens de polipropileno...40	

4.2.1. Estudo da produção de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 e <i>A. niger</i> NRRL 3122 utilizando bagaço de laranja lavado e não lavado como substrato.....	41
4.2.2. Estudo da produção de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 e <i>A. niger</i> NRRL 3122 com o substrato adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose).....	49
4.2.3. Estudo da produção de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 e <i>A. niger</i> NRRL 3122 com misturas de bagaço lavado e não lavado lavado como substrato.....	58
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
7. ANEXOS.....	78
Anexo A.....	78
Anexo B.....	79
Anexo C.....	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Meios de cultura para fermentação semi-sólida de bagaço de laranja.....	34
TABELA 4.1: Granulometria de bagaço de laranja lavado e não lavado.....	38
TABELA 4.2: Valores de pH, teores de umidade e ART do bagaço de laranja lavado e não lavado.....	39
TABELA D.1: Atividade de Pectinase de <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....	81
TABELA D.2: Atividade de pectinase de <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado e bagaço de laranja não lavado, bagaço de laranja lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....	82
TABELA D.3: Produtividade de Pectinase de <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....	83
TABELA D.4: Produtividade de pectinase de <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em	

bagaço de laranja lavado e bagaço de laranja não lavado, bagaço de laranja lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....84

TABELA D.5: pH de pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e lavado em porcentagens diferentes.....85

TABELA D.6: pH de pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e mistura do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.86

TABELA D.7: ART de pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.87

TABELA D.8: ART de pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas do bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.88

TABELA D.9: Valores de μmol de ácido galactutônico para cálculos da atividade de pectinase em função do tempo da reação enzimática.....89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Fluxograma de produção de enzimas por fermentação em meio semi-sólido.....	8
FIGURA 2.1: Estrutura molecular da cadeia principal das substâncias pécnicas.....	19
FIGURA 2.2: Mecanismo de ação da enzima pectinaesterase.....	20
FIGURA 2.3: Mecanismo de ação da enzima poligalacturonase.....	22
FIGURA 2.4: Mecanismo de ação da pectina-liase.....	23
FIGURA 3.1: Embalagens de polipropileno com os meios de fermentação.....	35
FIGURA 4.1: Hidrólise de pectina por pectinases de <i>P. italicum</i> IZ 1584 produzidas em diferentes concentrações em vários meios de fermentação com bagaço de laranja.....	40
FIGURA 4.2.1: Atividade de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado.....	42
FIGURA 4.2.2: Atividade de pectinase por <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado.....	42
FIGURA 4.2.3: Produtividade de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em Bagaço de laranja lavado e não lavado.....	44
FIGURA 4.2.4: Produtividade de pectinase por <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em	

bagaço de laranja lavado e não lavado.....	44
FIGURA 4.2.5: Teor de Açúcar Redutor (ART) em fermentação de bagaço de laranja por <i>P. italicum</i> IZ 1584.....	46
FIGURA 4.2.6: Teor de Açúcar Redutor (ART) em fermentação de bagaço de laranja por <i>A. niger</i> NRRL 3122.....	47
FIGURA 4.2.7: pH do meio de fermentação de <i>P. italicum</i> IZ 1584.....	48
FIGURA 4.2.8: : pH do meio de fermentação de <i>A. niger</i> NRRL 3122.....	48
FIGURA 4.2.9: Atividade de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado.....	50
FIGURA 4.2.10: Atividade de pectinase por <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado.....	50
FIGURA 4.2.11: Produtividade de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado.....	54
FIGURA 4.2.12: Produtividade de pectinase por <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado.....	54
FIGURA 4.2.13: Teor de Açúcar Redutor (ART) em fermentação de bagaço de	

laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado por <i>P. italicum</i> IZ 1584.....	55
FIGURA 4.2.14: Teor de Açúcar Redutor (ART) em fermentação de bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado por <i>A. niger</i> NRRL 3122.....	56
FIGURA 4.2.15: pH do meio de fermentação de <i>P. italicum</i> IZ 1584 de bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado.....	57
FIGURA 4.2.16: pH do meio de fermentação de <i>A. niger</i> NRRL 3122 de bagaço de laranja lavado, adicionado de açúcares e bagaço não lavado.....	57
FIGURA 4.2.17: Atividade de pectinase por <i>P. italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes	59
FIGURA 4.2.18: Atividade de pectinase por <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....	60
FIGURA 4.2.19: Produtividade de pectinase por <i>P.italicum</i> IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....	61
FIGURA 4.2.20: Produtividade de pectinase por <i>A. niger</i> NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....	62
FIGURA 4.2.21: Teor de Açúcar Redutor (ART) em fermentação por <i>P. italicum</i>	

IZ 1584 de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....63

FIGURA 4.2.22: Teor de Açúcar Redutor (ART) em fermentação por *A. niger* NRRL 3122 de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....64

FIGURA 4.2.23: pH do meio de fermentação por *P. italicum* IZ 1584 de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....65

FIGURA 4.2.24: pH do meio de fermentação de *A. niger* NRRL 3122 de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.....66

RESUMO

No presente trabalho, estudou-se a produção e produtividade de pectinase por *Penicillium italicum* IZ 1584 e por *Aspergillus niger* NRRL 3122 através de fermentação semi-sólida de bagaço de laranja industrialmente processado, em embalagens de polipropileno. Foram feitos ensaios com bagaço de laranja lavado e não lavado. A produção de pectinases com bagaço lavado iniciou-se mais cedo, porém os valores de atividade obtidos com o bagaço não lavado foram maiores para os dois microrganismos, sendo os valores da atividade do *P. italicum* IZ 1584 (15,1 UI/gMFU) maiores que os do *A. niger* NRRL 3122 (9,56 UI/gMFU).

Em ensaios utilizando bagaço de laranja lavado adicionado de açúcares sacarose, glicose ou frutose, observou-se atividade máxima no meio com sacarose (15,02 UI/gMFU), para o *P. italicum* IZ 1584, enquanto que os meios com glicose e frutose apresentaram valores próximos de atividade 6,88 UI/gMFU e 6,94 UI/g MFU, mas menores comparados com o meio com sacarose. O fungo *A. niger* NRRL 3122 produziu pouca atividade de pectinase nos meios aos quais foram adicionados os açúcares. A atividade máxima foi obtida em meio com glicose (1,98 UI/gMFU), valor próximo do meio com frutose (1,55 UI/gMFU) e o meio com sacarose foi o que apresentou o menor valor de atividade (1,1 UI/gMFU). O fungo *P. italicum* IZ 1584 mostrou-se mais adequado para a produção de pectinase nos meios de fermentação testados. A produção de pectinase por *P. italicum* IZ 1584 foi 37% maior que a produção por *A. niger* NRRL 3122 em bagaço não lavado, 40% em bagaço lavado, 93% em meio com sacarose, 28,8% em meio com glicose e 77,7% em meio com frutose.

Em fermentação utilizando misturas de bagaço lavado e não lavado em diferentes proporções, os maiores valores de atividade de pectinase também foram obtidos com o fungo *P. italicum* IZ 1584. O valor máximo de atividade de pectinase obtido (20,72 UI/gMFU), foi com o meio com 75% de bagaço lavado e 25% de bagaço não lavado, sendo este valor, o maior encontrado neste trabalho.

Palavras-chave: pectinase; *Penicillium italicum*; *Aspergillus niger*; bagaço; laranja.

ABSTRACT

The objective of this experimental work was to study the pectinase production and productivity by *Penicillium italicum* IZ 1584 and *Aspergillus niger* NRRL 3122, through solid-state fermentation in a medium containing processed orange bagasse as substrate, in flexible polypropilen packs. The initial experiments studied the medium composed by washed orange bagasse and no washed bagasse as source of carbon. The pectinases production with washed bagasse began earlier, however the activity values obtained with no washed bagasse were bigger for the two microorganisms 15.1 UI/gMFU and 9,56 UI/gMFU, respectively, *P. italicum* IZ 1584 and *A. niger* NRRL 3122.

In the experiments using washed orange bagasse supplemented with sugars (sucrose, glucose or fructose), a maximum activity was observed in the medium with sucrose (15.02 UI/g MFU) for the *P. italicum* IZ 1584, while the media with glucose or fructose presented close values of activity of 6.88 UI/gMFU and 6.94 UI/gMFU, respectively, but they were smaller when compared with the medium with sucrose. The fungus *A. niger* NRRL 3122 produced small pectinase activity in the media where sugars were added. The maximum activity was obtained in the medium with glucose (1,98 UI/gMFU), with similar value for the medium with fructose (1.55 UI/gMFU). The medium with sucrose (1.1UI/gMFU), presented the smallest activity value. The fungus *P. italicum* IZ 1584 showed best pectinase production in the tested fermentation media. The pectinase production by *P. italicum* IZ 1584 was 37% superior to the *A. niger* NRRL 3122 on no washed bagasse, 40% on washed bagasse, 93% on the medium with sucrose, 28.8% on the medium with glucose and 77% on the medium with fructose.

In fermentation using mixtures of washed bagasse and no washed bagasse in different proportions, the biggest values of pectinase activity were also obtained with the fungus *P. italicum* IZ 1584. The maximum value of activity (20.72UI/gMFU) was obtained on a medium with 75% washed bagasse and 25% no washed bagasse. This value was the maximum found in this work.

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

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria das indústrias, produzem além do produto final, um grande volume de resíduos e subprodutos. O mercado brasileiro apresenta enorme disponibilidade de resíduos e subprodutos agroindustriais, destacando-se as indústrias cítricas, processadoras de suco de laranja, onde cerca de 40% da matéria prima processada (laranja) se transforma em bagaço, as destilarias e refinarias que geram melaço, bagacilho e outros materiais lignocelulósicos residuais da cana. Esses subprodutos agroindustriais 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 da 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 consequência, 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, celulases, hemicelulases, amilases e arabinases têm sido produzidas industrialmente em diversos países. Algumas enzimas têm sido produzidas industrialmente pelo processo de fermentação, e uma variedade considerável de microrganismos podem produzi-las. Entre os microrganismos utilizados para a produção de pectinase pode-se citar: *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Flavobacterium sp*, *Candida utilis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, etc (WHITAKER, 1990).

As enzimas pectinolíticas são largamente empregadas nas indústrias de alimentos. Nas indústrias que processam frutas são muito utilizadas na extração do suco aumentando 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 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).

Em indústria têxtil, a adição de pectinases pode ser usada no tratamento de fibras brutas vegetais, onde 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).

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 ocorre 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 onde as pectinases estão presentes em baixas concentrações, sendo necessário adição de enzimas comerciais durante o processo industrial (PEPPLER e REED, 1987).

Atualmente, a técnica de fermentação para a produção de enzimas pectinolíticas está bem desenvolvida. Existem dois métodos principais de fermentação, sendo ambos eficientes: o de fermentação submersa e o de fermentação em meio semi-sólido.

A fermentação semi-sólida (SSF) 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. Os autores PANDEY (1991); CANNEL e MOO-YOUNG (1980); GUTIERREZ-ROJAS e TORRES (1992); LONSANE et al. (1992), definem o processo SSF como o crescimento de microrganismo em materiais sólidos umedecidos na ausência ou perto da ausência de

água livre. Esses autores citam algumas vantagens e desvantagens da fermentação semi-sólida quando comparadas a fermentação submersa.

Vantagens: redução dos problemas de contaminação; substratos simples e de baixo custo; ausência de espuma; a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária; eliminação da necessidade de solubilização do substrato; eliminação da necessidade de controle rigoroso de muitos parâmetros durante a fermentação; possibilidade da exclusão das etapas de concentração e/ou extração da enzima.

Desvantagens: dificuldades na remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo; dificuldade na medida e controle dos níveis de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados; os microrganismos utilizados são limitados àqueles que crescem em baixos níveis de umidade; necessidade de grande quantidade de inóculo e pré-tratamento do substrato.

Uma vez que o interesse pela SSF tem crescido significativamente a 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, esta técnica 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.

Tendo em vista o interesse mundial pela SSF, a importância industrial das enzimas pectinolíticas (não produzidas no Brasil) e a possibilidade da utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais abundantes, optou-se pela presente proposta de trabalho, cujo objetivo foi estudar a produção e produtividade das enzimas

pectinases por *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122 em embalagens de polipropileno, utilizando como substrato bagaço de laranja lavado e não lavado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. 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 catalizadores (enzimas), obtidas de microrganismos *in vivo* ou *in vitro* (ATKINSON, 1984).

Existem dois tipos de processos de fermentação para a produção de enzimas microbianas que são classificados conforme a quantidade de água do meio: a fermentação submersa e a semi-sólida.

2.1.1. Fermentação submersa (SmF)

SmF é aquela onde o substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. 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 SmF, 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 pode ser adequado para a produção de diversas enzimas. A maior parte das pectinases comerciais são enzimas indutíveis e substratos com altos teores de pectina, como polpa de

beterraba, casca de cítricos e polpa de maçã, devem ser adicionados ao meio de fermentação para que a produção da enzima seja estimulada.

2.1.2. Fermentação em meio semi-sólido (SSF)

A SSF pode ser definida como aquela onde o substrato é um material úmido, não suspenso em água e sem escorrimento aquoso, que permite o desenvolvimento de fermentação empregando um ou mais microrganismos. (GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES, 1992). O processo SSF é mostrado no esquema genérico de produção de enzimas na Figura 1.1.

De acordo com HESSELTINE (1972); RAIMBAULT (1980); MOO-YOUNG et al. (1983) e ORIOL (1988), na SSF o microrganismo é inoculado em um substrato aparentemente sólido (úmido), ou seja, na ausência de água livre. Assim a atividade microbiana se dá em toda a massa úmida. 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.

O SSF é o mais usado no Oriente, mas nos últimos anos essa prática tem sido de grande interesse no mundo ocidental também, pois este apresenta algumas vantagens sobre o processo de SmF: o sistema utiliza menos energia, os reatores são de tamanhos menores, a extração é mais fácil pois o produto é mais concentrado; necessita de pouco controle do processo; porém existem algumas limitações, como o problema de transferência de calor e massa; o substrato necessita de um pré-tratamento e o controle do processo é difícil; exige muita mão-de-obra e são poucos os conhecimentos técnicos, fisiológicos e bioquímicos dos microrganismos desenvolvidos nesse meio (GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES, 1992).

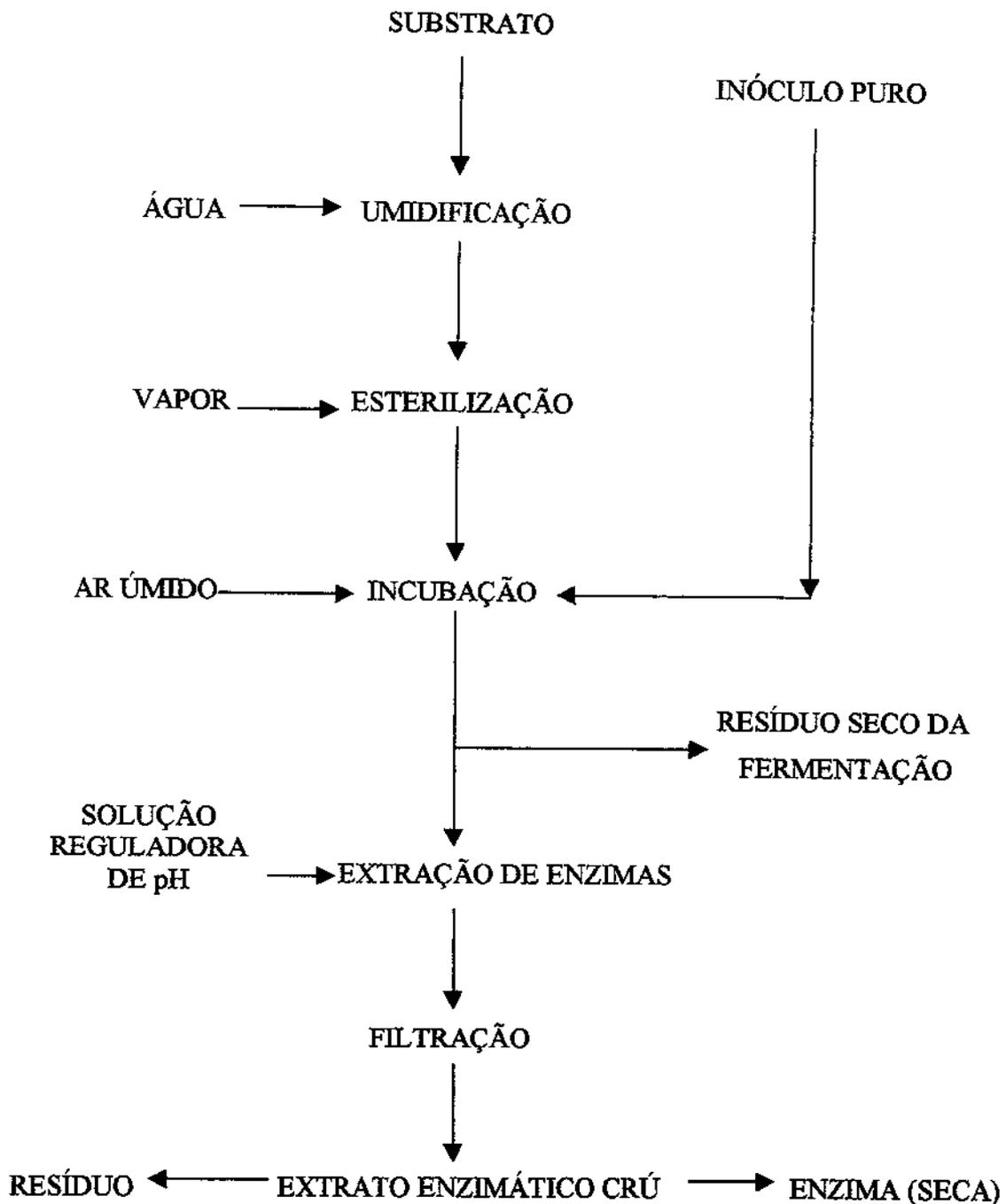


FIGURA 1.1. Fluxograma de produção de enzimas por SSF.

(GUTIERREZ-ROJAS e FAVELA TORRES, 1992).

HESSELTINE (1972) descreve as características das SSF quando o sistema é submetido a 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 SSF 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; as condições de crescimento de fungos são parecidas com as de seu habitat natural. Normalmente, maiores taxas de produção são obtidas em SSF em relação à SmF 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 de 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; requerimento de considerável desenvolvimento na parte de engenharia, incluindo a relação entre a quantidade ótima de substrato e a forma e dimensão do fermentador.

Comparando a produção de α -amilase de *A. orizae* SCM por SmF e SSF, SHAH et al. (1991) chegaram a conclusão de que a SSF é mais econômica.

Por outro lado, HERNANDEZ et al. (1992) compararam a produção de alcalóides por *Claviceps fusiformis* pelo método de SmF e por SSF e observaram aumento na produção de 3,9 vezes, quando usada a SSF.

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

2.2. Reatores para a SSF

Na escolha do fermentador para a realização de uma fermentação deve-se 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, se houver necessidade, e a manipulação simplificada do sistema (carga/ regarga, limpeza, manutenção). 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 e da dissipação do calor (CANNEL e MOO-YOUNG, 1980; DURAND et al., 1988).

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. Garrafas de cultura embora excelentes para o início de uma pesquisa, deixam a desejar quando se pensa em uma ampliação de escala do processo. Diversos tipos de reatores têm sido propostos para amenizar os problemas de aeração , troca de calor e umidade, entre outros.

Estudos de SSF 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 o sistema, com fração de corte igual a 75%, quando esta operação foi realizada após certo tempo de fermentação, obteve-se a atividade máxima de pectinase 11% maior que o valor obtido com o sistema descontínuo.

Bandejas: 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 haja 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).

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 controles 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. Também foram verificados os efeitos da temperatura de extração e do solvente empregado, além do efeito da concentração de etanol e do tempo na precipitação da enzima. Utilizando o material fermentado seco, foram testados os solventes água, água destilada e tampão fosfato 0,1 M, sob temperaturas de 4°C e ambiente (25°C a 28°C). As

atividades pectinolíticas obtidas com a extração sob temperatura ambiente foram praticamente as mesmas para todos os solventes. As extrações a 4°C com tampão fosfato 0,1 M e água destilada apresentaram uma recuperação de enzima ligeiramente superior às anteriormente citadas. A precipitação da enzima a partir do extrato líquido foi estudada empregando-se várias concentrações de etanol, em diferentes intervalos de tempo de 5 minutos a 6 horas. Houve perda significativa de atividade pectinolítica com o aumento do tempo de contato entre a enzima e a solução de etanol, concluindo-se que o processo deve ser realizado da forma mais rápida possível. A concentração de etanol ótima para extração da enzima (em solução) foi 50%.

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

Esteira rolante: 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.

Tubular Horizontal: 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).

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.

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, a 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).

COSTA (1996) produziu amiloglicosidase por *A. niger* NRRL 3122 em SSF 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/g 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, tendo 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 e apresentaram um maior gradiente radial da temperatura.

Embalagens plásticas: 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 SSF de bagaço de laranja industrialmente processado, em embalagens de polipropileno. Concluiu que esse fungo foi capaz de produzir a enzima pectinase

extracelularmente, sendo esta atividade incrementada quando a sacarose estava presente no meio de cultivo. Observou também, que a produção de pectinase por SSF com bagaço de laranja lavado, mostrou-se ser mais efetiva frente ao bagaço de laranja não lavado e apresentou maiores 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.

2.3. Controles do processo

Como em todo processo fermentativo, o controle de determinados parâmetros se faz 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 SSF. 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 SSF pode variar entre 18 e 85%.

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, à 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 às 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).

pH: O controle do pH durante a SSF, 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).

Aeração: 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, o 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 CO₂ e outros metabólitos voláteis eliminados e da necessidade de oxigênio para a síntese dos produtos (LONSANE, et al., 1985).

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).

Estimativa e característica de crescimento: A sequência de crescimento microbiano em meio de cultura, em condições ótimas, envolve a germinação nas primeiras horas, seguido de um aumento gradual de temperatura devido ao início das atividades metabólicas, uma taxa crescente das atividades metabólicas, da fase estacionária e de declínio. A duração de cada etapa vai depender das condições de fermentação, do microrganismo empregado e do produto que se deseja obter (LONSANE, 1985). O fungo filamentosos tem a capacidade de penetrar nos espaços inter e intracelulares por meios mecânicos ou enzimáticos, com a firme fixação das hifas na superfície do substrato e posterior ramificação intensa e penetração na parede celular do substrato, 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: Existem poucas informações disponíveis na literatura relacionadas a estudos de extração de produtos obtidos por SSF. Para extração de enzimas extracelulares, são utilizados diluentes, como água corrente, água destilada, solução diluída de sais ou solução tampão.

2.4. 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 α -1,4, com seus grupos carboxílicos

parcialmente esterificados com grupos metoxílicos, conforme apresentado na Figura 2.1.

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

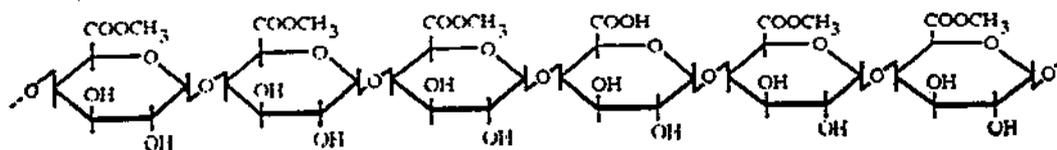


FIGURA 2.1. Estrutura molecular da cadeia principal das substâncias pécticas.

2.4.1. 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), poligalacturonato liase (PGL) (WHITAKER, 1990). O anexo A mostra o esquema da ação das frações pectinolíticas sobre a cadeia de pectina.

2.4.1.1. Pectinaesterase (PMGE): Esta fração atua sobre a pectina através de um mecanismo de hidrólise (Figura 2.2), removendo o grupo metoxílico do grupo

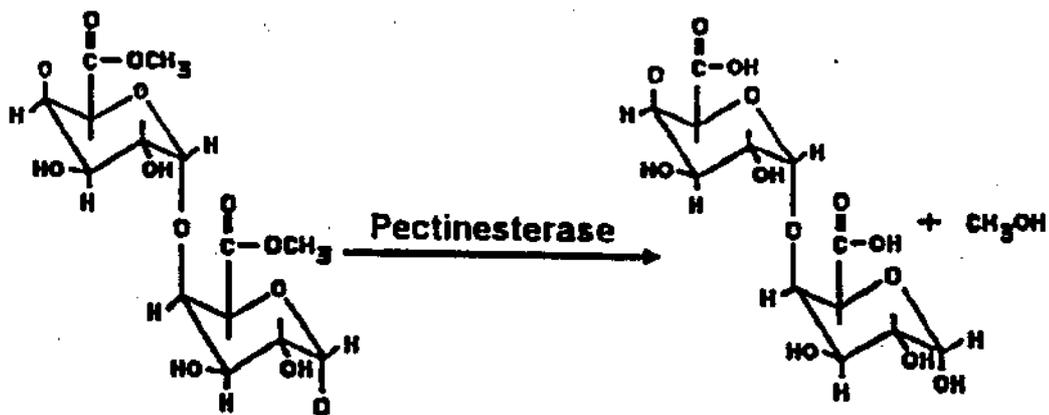


FIGURA 2.2. Mecanismo de ação da enzima pectinaesterase.

(Fonte: MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

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 (WHITAKER, 1990).

2.4.1.2. 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 deste 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.

2.4.1.3. 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 2.3). 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).

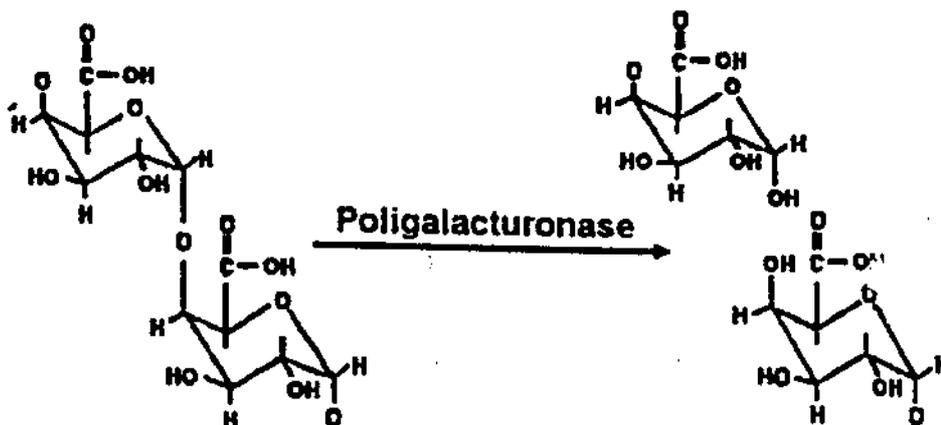


FIGURA 2.3. Mecanismo de ação da enzima poligalacturonase.

(Fonte: MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

2.4.1.4. 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).

2.4.1.5. 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. 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).

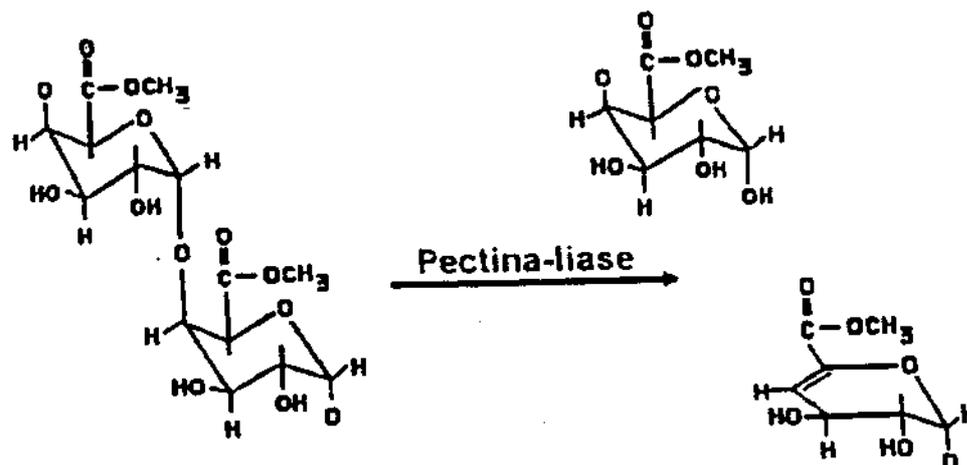


FIGURA 2.4. Mecanismo de ação da enzima pectina-liase.

(Fonte: MACMILLAN e SHEIMAN, 1974)

2.4.2. Produção de Enzimas Pectinolíticas

A produção de pectinases em larga escala é feita basicamente por fungos, particularmente do gênero *Aspergillus*. As características das enzimas obtidas a partir destas fontes tornam-nas ideais para o processamento de frutas, sendo esta sua principal aplicação. 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).

MENEZES et al. (1989) estudaram a produção de proteína microbiana (SCP) para a ração animal em SSF, utilizando bagaço de polpa de laranja previamente neutralizado e peletizado como substrato, enriquecido com sais nutrientes. Utilizaram os fungos *A. niger* An-8, *Rhizopus* Rh-3 e *Pleorotus ostreatus*. Dependendo da espécie utilizada, verificaram que o teor médio de proteína no meio fermentado atingiu 12% a 15% e que o fungo *A. niger* foi o mais efetivo, devido ao seu eficiente sistema enzimático. O fungo *Pleorotus ostreatus* não foi capaz de converter o substrato em proteína, pois segundo os autores a presença de óleo essencial da casca de laranja no bagaço, inibiu o crescimento do microrganismo.

ALANÑA 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 SSF de *P. italicum* CECT 2294, foram estudadas por ALAÑA et al. (1990). Neste estudo foi observado que o fungo produziu atividade de PMGL extracelular, induzida por pectinas com alto grau de esterificação, a baixos valores de pH e apresentou baixas atividades de PG e PGL em SSF e nenhuma atividade em SmF. A atividade de PMGL obtida das SmF e SSF foi maior sobre pectina com maior grau de esterificação. Na SmF, o pH ótimo para a produção de PMGL esteve entre 6,0 e 7,0 sendo que a enzima teve maior atividade em tampão citrato- fosfato (pH 3,0 a 7,0), comparanda ao tampão tris-HCl (pH 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 fôra 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, ácido poligalacturônico foi estudada por AGUILAR e HUTTRON (1990). Esses autores concluíram que no meio contendo glicose como substrato ocorreu atividade de enzimas constitutivas. Os meios com sacarose, frutose, glicerol, ácido galacturônico ou glicose enriquecidos com extrato de levedura tiveram crescimento celular máximo iguais aos meios somente com

glicose, sacarose, frutose ou glicerol. O meio com ácido galacturônico teve seu crescimento 56% maior comparado com os outros meios.

BARACAT et al. (1991) estudaram a utilização de polpa de laranja em SmF 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 à atividade da fração PG.

SAID et al. (1991) estudaram a produção de pectinases por *P. frequentans* em SmF. Concluíram que a melhor temperatura para a produção de pectinase ficou entre 30 e 35°C. Neste estudo foi observado atividade 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, ácido poligalacturônico e casca de citrus induziram a produção de pectinases e a adição de arabinose, celobiose, celulose, frutose, galactose, glucose, maltose, manitol, manose, sacarose, trealose e xilose não induziram a produção de pectinases.

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 e incubadas por 10 minutos, apresentaram temperatura ótima de 45°C. A atividade da enzima exo-PG apresentou uma diminuição da atividade a 65°C/10 minutos, sendo completamente inativada após incubação a 60°C/4h. A fração exo-PMG exibiu 40% de sua atividade máxima após a incubação à temperatura de 45°C/4h e 50% de atividade após 60°C/4h, sendo completamente inativada quando submetida a temperatura de 80°C/4h. O pH ótimo para a exo-PMG foi 5,0, enquanto que para a fração exo-PG foi pH 4,0. O modo de ação das exo-pectinases foi determinado pela verificação de que o único produto obtido no início da reação apresentava baixo peso molecular (RIOU et al. , 1992).

MIKHAILOLOVA et al. (1994) estudaram a biossíntese de PL de *P. adametzii*, *P. citrinum* e *P. janthinellum* em SmF. Concluíram que os substratos com pectina de maçã e beterraba e ácido D-galacturônico foram ótimos 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 nas primeiras 72 horas, quando foi detectada 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 pectinálises foram observadas após 24 horas de fermentação e após 72 horas foi detectada a endo-PL e sua atividade máxima ocorreu com 96 horas de fermentação. Também foi estudada a repressão da síntese enzimática com meio contendo 0,2% ou de pectina de maçã ou de glicose, a combinação de ambos e adenosina monofosfato cíclico (cAMP). O cAMP não 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.

GALIOTOU-PANAYOTOU et al. (1997) estudaram as condições de crescimento de *A. sp.* ATHUM-3482 em SmF, 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.

ANTIER et al. (1993) estudaram a produção de pectinases em SSF, 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).

ISMAIL (1996) utilizou bagaço de laranja como fonte de carbono para a produção de um complexo multienzimático contendo pectinases, celulases e xilanases em SmF. 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.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Substrato para cultivo dos fungos

A matéria prima utilizada foi o subproduto sólido de indústrias de suco cítrico (“pellets” de laranja), constituída basicamente de membranas, sementes e polpa, obtida junto à indústria cítrica CITROVITA - Agroindustrial Ltda - Catanduva S. P.. O bagaço de laranja foi produzido a partir do processamento de laranjas das variedades Natal e Valência colhidas no mês de dezembro de 1997 de acordo com o esquema do anexo C. A composição química do material é constituída de fibras, proteínas, gordura, nitrogênio, minerais (cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio), açúcares, óleos essenciais e pectina. (*)

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, Hz 0-60, 120 volts, 9000 rpm, 5/8 Hp e foi utilizado peneira número 0,5.

3.2.2. Lavagem e secagem

Parte do bagaço moido não foi lavado e a outra parte do bagaço foi lavada em água corrente em vasilha de plástico amparada com peneira Bender USS 230, tyler

(*) Comunicação pessoal do Eng. de Alimentos José Orlando Ferreira - Dep. Controle de Qualidade - CITROVITA- Agroindustrial Ltda-Catanduva S.P.

250, 0,062 mm para separar as partículas sólidas. Esta lavagem repetiu-se até que se obtivesse um teor de açúcares redutores totais (ART) inferior a 1% do bagaço seco. Após a lavagem, o bagaço foi secado ao sol até teor de umidade entre 14 a 15,5 %.

3.3. Caracterização do substrato

3.3.1. Granulometria

A análise granulométrica do bagaço de laranja triturado foi realizada em agitador de peneiras tipo magnético, marca Bertel, máquina número 319, série 8703, com escala variável de agitação (0 a 10). Foram realizadas 3 repetições para o bagaço não lavado, utilizando-se 4 peneiras marca Granutest : 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) e o experimento foi realizado por um período de 30 minutos. Após a secagem do bagaço lavado, foi adotado o mesmo procedimento.

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 da marca Sartorius Analytic, modelo A200S.

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 Somogy -Nelson)

3.4.1. Preparo dos reagentes

Este método emprega duas soluções distintas. A primeira, denominada de Reagente de Somogy-Nelson I foi preparada pela dissolução de 4,0 g de sulfato de cobre (CuSO_4), 24,0 g de Na_2SO_3 anidro, 16,0 g de NaHCO_3 , 12,0 g de tartarato de sódio e potássio e 18,0 g de Na_2SO_4 , nesta ordem, em 600 ml de água destilada. O volume foi completado para 1,0 litro em balão volumétrico e a solução 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 Somogy-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 Na_2HAsO_4 anidro em 50 ml de água destilada. O Reagente de Somogy-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 foi iniciado pela adição de 2,0 ml de Reagente de Somogy-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 Somogy-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. Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram os fungos *Penicillium italicum* IZ 1584, obtido junto ao Instituto Zimotécnico, ESALQ/USP, Piracicaba, S.P. e *Aspergillus niger* NRRL 3122 obtido junto a Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello-Campinas S.P. A manutenção do fungo *P. italicum* IZ 1584 foi feita através de repiques quinzenais sucessivos em tubos de ensaio contendo meio ágar-batata-dextrose (BDA) inclinado, os quais foram incubados a 28°C após a inoculação. O fungo *A. niger* NRRL 3122 foi mantido através de repiques quinzenais sucessivos em tubos de ensaio contendo meio MEA (extrato de malte, peptona, glicose, ágar e água) e incubados a 30°C.

3.6. Inóculo

O inóculo para a SSF foi preparado pela adição de tween 80 0,01% aos tubos

de ensaio contendo as culturas puras dos fungos *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122, desenvolvidas por 7 dias a 28°C em meio BDA inclinado e a 30°C em meio MEA, respectivamente. As suspensões de esporos obtidas após raspagem do ágar com alça de inoculação, seguida de agitação manual, foram ajustadas para uso posterior.

3.7. Contagem de esporos e inoculação

A contagem de esporos em cada suspensão obtida no item 3.5, foi feita através de microscópio óptico em duplicatas, utilizando-se câmara de Neubauer. Foi utilizado um volume de suspensão equivalente a 3 ml de suspensão de esporos para cada 30g de substrato sólido.

3.8. Meios de cultura

Os meios de cultivo para a SSF foram definidos a partir do meio utilizado por MENEZES et al. (1989) e por HENNIES (1996). Nos meios de fermentação foram utilizados bagaço de laranja lavado e não lavado como substrato, bagaço de laranja lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço lavado e não lavado em diferentes proporções. Todos os meios foram enriquecidos por soluções de nutrientes minerais como são mostrados na Tabela 3.1.

3.9. Sistema de Fermentação

3.9.1. SSF em embalagens de polipropileno

Trinta gramas (30g) de bagaço de laranja lavado, não lavado, suas misturas e adicionados de açúcares, foram acondicionados em embalagens de polipropileno de

TABELA 3.1.1. Composição dos meios de SSF para a produção de pectinases por *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122.

COMPONENTES	MEIOS DE FERMENTAÇÃO							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Bagaço de laranja lavado	30g	-	30g	30g	30g	22,5g	15g	7,5g
Bagaço de laranja não lavado	-	30g	-	-	-	7,5g	15g	22,5g
NH ₄ NO ₃	1,8g	1,8g	1,8g	1,8g	1,8g	1,8g	1,8g	1,8g
KH ₂ PO ₄	0,12g	0,12g	0,12g	0,12g	0,12g	0,12g	0,12g	0,12g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,18g	0,18g	0,18g	0,18g	0,18g	0,18g	0,18g	0,18g
Sacarose	-	-	5,7g	-	-	-	-	-
Glicose	-	-	-	5,7g	-	-	-	-
Frutose	-	-	-	-	5,7g	-	-	-

dimensões 20,0 cm x 30,2 cm (Figura 3.1) 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 ($5,45 \times 10^7$ de *P. italicum* IZ 1584 e $7,57 \times 10^7$ de *A. niger* NRRL 3122) previamente preparados conforme item 3.5.1., e em seguida foram incubados a 28°C e 30°C, respectivamente.

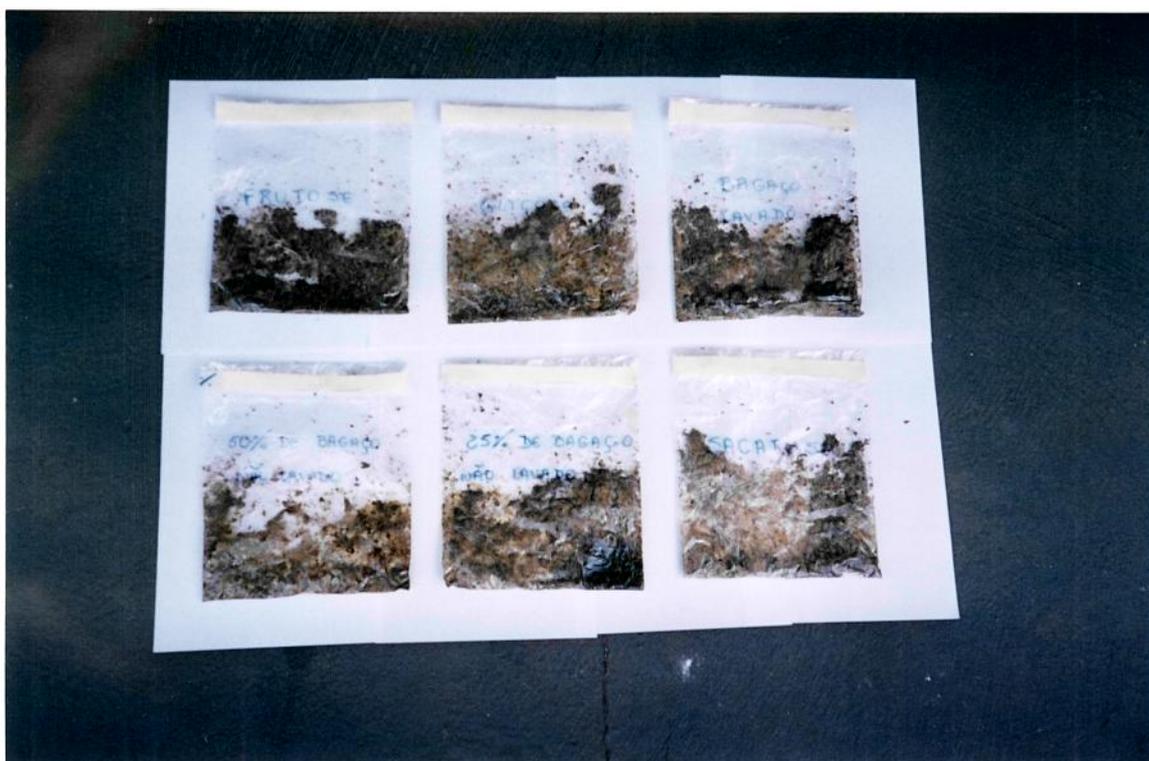


FIGURA 3.1. Embalagens de polipropileno com os meios de fermentação.

3.10. Extração da enzima

Depois de fermentado, o material foi homogeneizado e retiradas amostras de cada embalagem para a extração da enzima. Após, as embalagens foram seladas e novamente incubadas, de onde foram retiradas amostras ao longo da fermentação. Para 5g 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, atividade enzimática e açúcares redutores totais (ART).

3.11. Estudo do tempo da reação enzimática

Uma alíquota do extrato enzimático bruto (item 3.10 - 0,5 ml), foi misturada a 0,5 ml de solução a 1% de pectina cítrica 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 Somogy-Nelson, presentes nas amostras de vários meios de fermentação, com diferentes concentrações de enzimas produzidas. Foi realizado o estudo de melhor tempo de reação, para ser efetuados os cálculos das atividades enzimáticas.

3.12. Determinação das atividades enzimáticas

A atividade enzimática foi determinada pela quantificação dos grupos redutores liberados na reação enzimática. Uma alíquota do extrato enzimático bruto (0,5 ml), foi misturada a 0,5 ml de solução de pectina cítrica 0,1% em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 e incubada em banho-maria a 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 ebulição por 10 minutos.

A quantificação dos grupos redutores, expressos como ácido galacturônico, foi realizada pelo método de Somogy-Nelson. A atividade de pectinase foi calculada pela diferença entre as concentrações dos grupos redutores presentes nas amostras e nos respectivos controles. Uma unidade internacional de atividade (UI) foi definida como μmol de ácido galacturônico produzido por ml de enzima por minuto. Para a SSF a atividade enzimática foi expressa em UI por grama de material fermentado úmido (UI/gMFU).

3.13. Determinação da produtividade

A produtividade foi determinada através do quociente da atividade obtida no item 3.12 pelo tempo de fermentação.

3.14. Determinação de açúcares redutores totais no extrato enzimático

O teor de açúcares redutores totais no extrato enzimático foi determinado pelo método de Somogy Nelson (item 3.4). Uma alíquota de 5 ml do extrato enzimático foi misturado a 1 ml de HCl 2N e levado em ebulição por 10 minutos. Após resfriamento, foi neutralizado com NaOH 2N. A amostra assim preparada foi utilizada para determinar açúcares redutores totais (item 3.4.2).

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do substrato da SSF

4.1.1. Granulometria do bagaço lavado e não lavado

Os dados médios do perfil granulométrico dos bagaços lavado e não lavado, para três repetições, conforme especificado no item 3.3.1, são apresentados na Tabela 4.1. Os resultados mostram que cerca de 98,13% e 88,84% do material lavado e não lavado, respectivamente, apresentaram granulometria igual ou superior a 0,21mm (peneira).

TABELA 4.1.: Granulometria do bagaço de laranja lavado e não lavado.

Peneira (ABTN)	Abertura (mm)	Massa de bagaço Retido (g)	
		bagaço lavado	bagaço não lavado
12	1,68	15,21	14,8
16	1,19	16,27	15,47
25	0,71	36,35	23,3
70	0,21	30,30	35,3
Fundo	-	1,16	11,13
Total	-	100,00	100,00

Comparando-se os resultados do bagaço de laranja lavado com os resultados do bagaço de laranja não lavado, percebe-se uma diminuição significativa da quantidade de finos. Isto se deve basicamente a dois fatores; o primeiro é a formação de grumos durante a secagem do material lavado e o segundo é a perda de finos durante a lavagem.

4.1.2. Valores de pH, teores de umidade e ART

Foram realizadas quatro determinações de pH com o bagaço de laranja lavado e não lavado. O pH médio obtido para o bagaço de laranja lavado foi 5,97 e o não lavado apresentou pH 4,56, o que pode ser explicado pelo fato da água de lavagem ter retirado uma parcela das substâncias ácidas presentes inicialmente no bagaço de laranja não lavado. O bagaço de laranja lavado e não lavado apresentaram umidades de 14,33% e 14,2%, respectivamente. O processo de lavagem do bagaço eliminou praticamente todos os açúcares solúveis, cujo teor passou de 19,04% para apenas 0,16% (Tabela 4.2).

TABELA 4.2. Valores de pH, umidade e ART de bagaço de laranja lavado e não lavado.

	bagaço lavado	bagaço não lavado
PH	5,97	4,56
Umidade (%)	14,33	14,2
ART (%)	0,16	19,4

4.1.3. Estudo do tempo da reação enzimática

Para a determinação da atividade de pectinases houve necessidade de se adequar o tempo de reação, como descrito no item 3.11. Observa-se pela Figura 4.1 que a concentração de substâncias redutoras aumenta significativamente até 20 minutos de reação e, após este intervalo de tempo, a concentração de substâncias redutoras permanece praticamente constante, indicando que a reação foi interrompida, ou por inibição das enzimas pelo produto ou pela baixa concentração de substrato remanescente na mistura reacional. Desta forma, adotou-se o tempo de

20 minutos de reação em todas as análises subseqüentes para determinação de atividade enzimática.

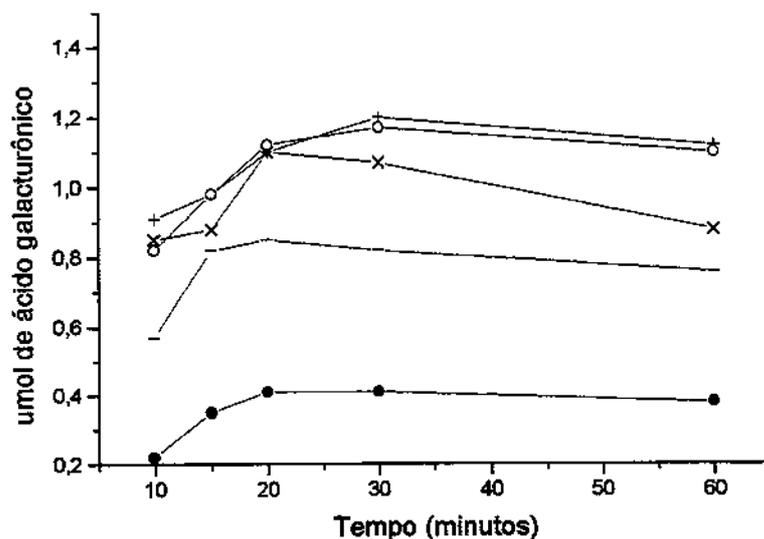


Figura 4.1. Hidrólise de pectina por pectinases de *P. italicum* IZ 1584 produzidas em diferentes concentrações em vários meios de fermentação com bagaço de laranja (• C1, - C2, x C3, o C4 e + C5).

4.2. Fermentação em meio semi-sólido em embalagens de polipropileno

A fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno mostrou-se efetiva. Comparando-se com os frascos erlenmeyer tradicionalmente empregados, as embalagens permitiram uma boa homogeneização do material e reduziram as perdas de amostras (principalmente na quebra de frascos). Estas embalagens além de suportarem as temperaturas de esterilização, são permeáveis ao oxigênio e ao gás carbônico, são de baixo custo e fácil manuseio.

4.2.1. Estudo da produção de pectinase pelos fungos *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122 utilizando bagaço de laranja lavado e não lavado como substrato.

Neste estudo foram analisadas a atividade de pectinase, produtividade, teor de ART e pH dos meios de fermentações sem adição de açúcares, para os dois fungos estudados, como mostram as Figuras 4.2.1. a 4.2.8.

Pela Figura 4.2.1 e Figura 4.2.2 observa-se que a produção de pectinases utilizando bagaço de laranja lavado iniciou-se mais cedo, porém os valores de atividade obtidos com bagaço não lavado foram maiores ao final do processo fermentativo. O açúcar presente no bagaço não lavado, provavelmente, inibiu a produção de enzimas no início da fermentação, mas ao mesmo tempo permitiu maior desenvolvimento de massa celular, o que foi observado visualmente. Como consequência da maior massa celular produzida, houve maior produção de enzimas a partir do quarto dia de incubação. Pode-se observar que a máxima atividade de pectinases de *P. italicum* IZ 1584 (Figura 4.2.1), obtida com o bagaço de laranja não lavado foi de 15,1 UI/gMFU, após o décimo quinto dia de fermentação e para o *A. niger* NRRL 3122 (Figura 4.2.2) foi de 9,56 UI/gMFU, após o décimo sétimo dia de fermentação, enquanto que com o bagaço lavado a máxima atividade de pectinases de *P. italicum* IZ 1584 foi de 11,94 UI/gMFU, após o décimo sétimo dia de fermentação e para o *A. niger* NRRL 3122 foi de 7,2 UI/gMFU, após o décimo quarto dia. A fermentação do bagaço não lavado por *P. italicum* IZ 1584 levou à produção de 21% a mais de enzimas do que aquela obtida com bagaço lavado. Nas fermentações com *A. niger* NRRL 3122 essa diferença foi de 25%.

Alguns pesquisadores (MALDONADO et al. 1986) relatam em seus trabalhos que bagaços de citrus industrializados, quando utilizados como substrato na

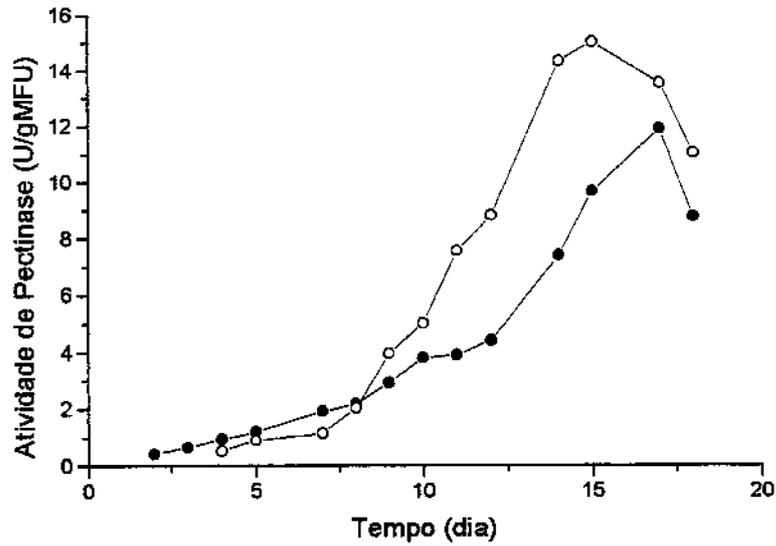


FIGURA 4.2.1. Atividade de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado (• M1 -bagaço lavado; o M2-bagaço não lavado).

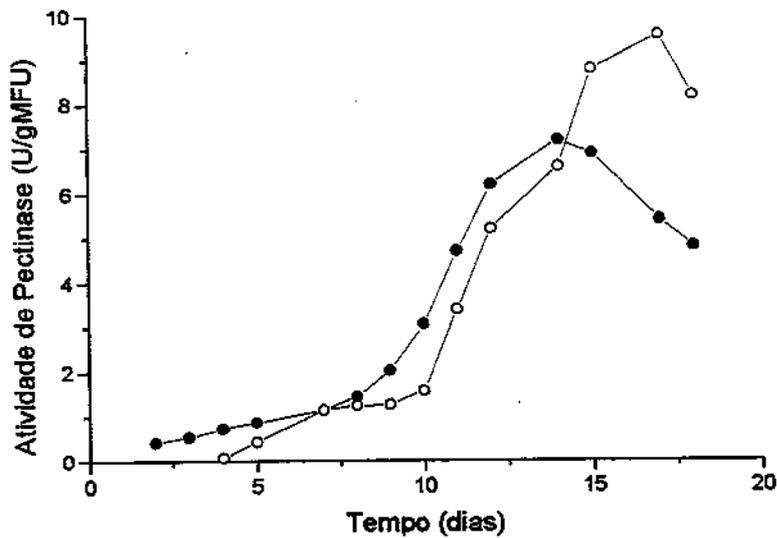


FIGURA 4.2.2. Atividade de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço lavado e não lavado (• M1 - bagaço lavado); o M2 - bagaço não lavado).

fermentação, levam a menor produção de pectinases quando comparada com bagaço de citrus não industrializados. Alegam que durante o processamento para a produção de ração, o bagaço de laranja sofre tratamento químico com hidróxido de sódio para sua neutralização, seguido de intenso tratamento térmico para a secagem. Este tratamento promove reações cujos produtos podem contribuir direta ou indiretamente para a diminuição das atividades microbiana e pectinolítica, além de que a elevada concentração de açúcares redutores totais no bagaço de laranja poderia ser um fator inibitório para a produção de atividade de pectinase. Dessa forma, as diferenças nos processos industriais a que são submetidos os bagaços, podem também interferir nos resultados de produção de enzimas.

Pela Figura 4.2.1 e Figura 4.2.2 pode-se observar ainda que a produção de pectinases de *P. italicum* IZ 1584, foi 36,7% maior do que a de *A. niger* NRRL 3122, quando utilizou-se bagaço de laranja não lavado e 39,7% maior, quando o bagaço utilizado foi lavado. O fungo *P. italicum* IZ 1584 mostrou-se mais efetivo em relação aos substratos utilizados, sendo que maiores atividades de pectinase foram obtidas após o décimo quinto dia de fermentação. Visualmente, pôde-se observar que o fungo *P. italicum* IZ 1584 produziu maior massa micelial que o *A. niger* NRRL 3122, o que pode ter proporcionado maior produção da atividade de pectinases.

A Figura 4.2.3 e a Figura 4.2.4, mostram as curvas de produtividade de enzimas pectinolíticas para ambos os substratos utilizados (bagaço lavado e não lavado) sem adição de açúcares. Observa-se que os valores de produtividade utilizando bagaço não lavado foram maiores que os valores obtidos com bagaço lavado, a partir do oitavo dia de fermentação. O valor máximo de produtividade foi obtido no décimo quarto dia para o bagaço não lavado (1,02 U/dia) e no décimo sétimo dia para o bagaço lavado (0,7 U/dia) para o fungo *P. italicum* IZ 1584. Para o fungo *A. niger* NRRL 3122 o valor máximo de

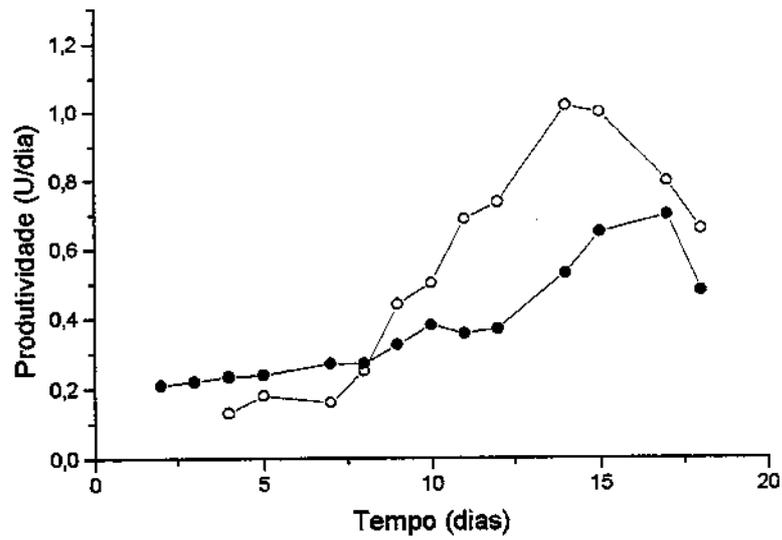


FIGURA 4.2.3. Produtividade de pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado (• M1- bagaço lavado; o M2 -bagaço não lavado).

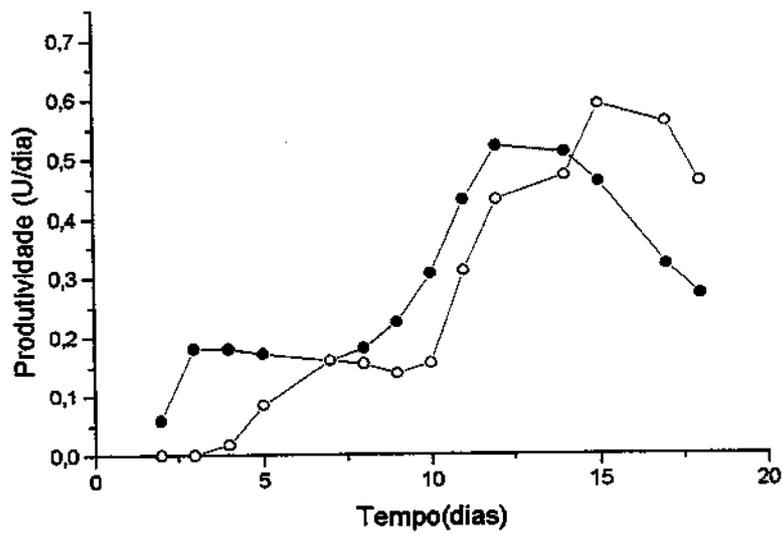


FIGURA 4.2.4. Produtividade de pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado e não lavado (• M1- bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado).

produtividade foi obtido no décimo quinto dia para o bagaço não lavado (0,57 U/dia) e no décimo segundo dia para o bagaço lavado (0,5 U/dia). Em semelhança a atividade de pectinases, os valores de produtividade foram maiores para o meio com bagaço não lavado e com o fungo *P. italicum* IZ 1584.

A Figura 4.2.5 e a Figura 4.2.6 mostram os teores de açúcares redutores totais em ambos os substratos, em função do tempo de fermentação por *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122. Os açúcares redutores presentes no meio de cultivo de bagaço de laranja não lavado fermentado por *P. italicum* IZ 1584 foram reduzidos lentamente até o sétimo dia de cultivo, caindo então abruptamente até o décimo segundo dia de fermentação. A concentração de açúcares no meio com bagaço lavado, permaneceu constante ao longo do período de fermentação. A comparação entre a produção de pectinases (Figura 4.2.1) e o consumo de açúcar redutor (Figura 4.2.5) pelo fungo *P. italicum* IZ 1584, indica que a produção de pectinases iniciou-se após a redução do açúcar a níveis mínimos, o que ocorreu após o décimo dia de cultivo. Esses dados sugerem a inibição da produção da enzima pelos açúcares disponíveis no meio de cultura.

Por outro lado, o alto teor de açúcar redutor permitiu um maior desenvolvimento da biomassa micelial, o que possibilitou a maior produção da atividade de pectinases observada nesse meio, após o décimo quinto dia de cultivo. Entretanto, a quantificação da biomassa produzida não foi realizada, em função da dificuldade desse tipo de análise em SSF, embora o crescimento tenha sido acompanhado visualmente ao longo do percurso fermentativo.

Em cultivo do fungo *A. niger* NRRL 3122, o consumo de açúcares foi mais rápido. Após o quinto dia de fermentação a concentração de açúcares redutores no substrato ficaram próximos dos valores do substrato com bagaço lavado. Observa-se que no meio com bagaço não lavado, o início da produção das enzimas ocorreu no

quinto dia de fermentação (Figura 4.2.2), coincidindo com o menor teor de ART do meio.

No bagaço lavado, a produção da enzima por ambos os fungos iniciou-se após 48 horas de cultivo. O pico de produção nesse meio, ocorreu após o décimo sétimo dia para o *P. italicum* IZ 1584 e após o décimo primeiro dia para o *A. niger* NRRL 3122. Deve-se considerar que, não havendo açúcar facilmente disponível aos microrganismos, o crescimento dos mesmos só iniciou-se, após a degradação do substrato para a liberação de monômeros que pudessem ser absorvidos pelo fungo, o que retardou a formação do micélio e a liberação das enzimas em quantidades detectáveis.

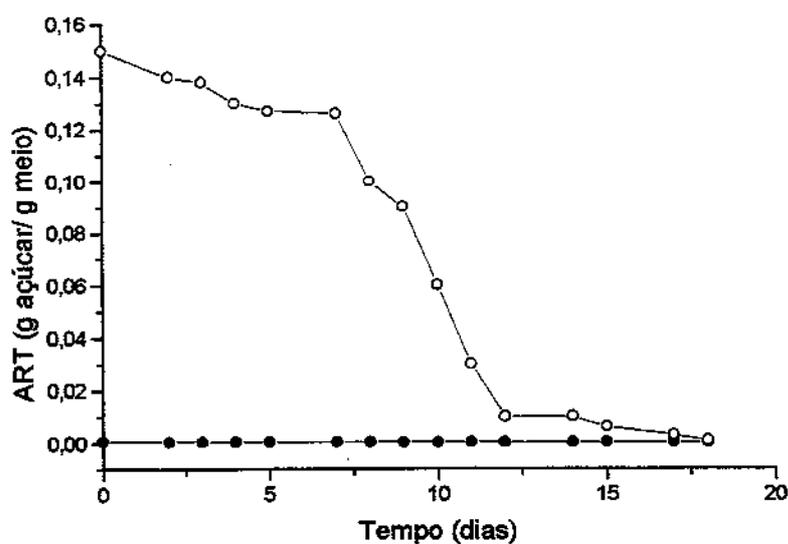


FIGURA 4.2.5. Açúcares redutores totais (ART) do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *P. italicum* IZ 1584 (• M1 - bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado).

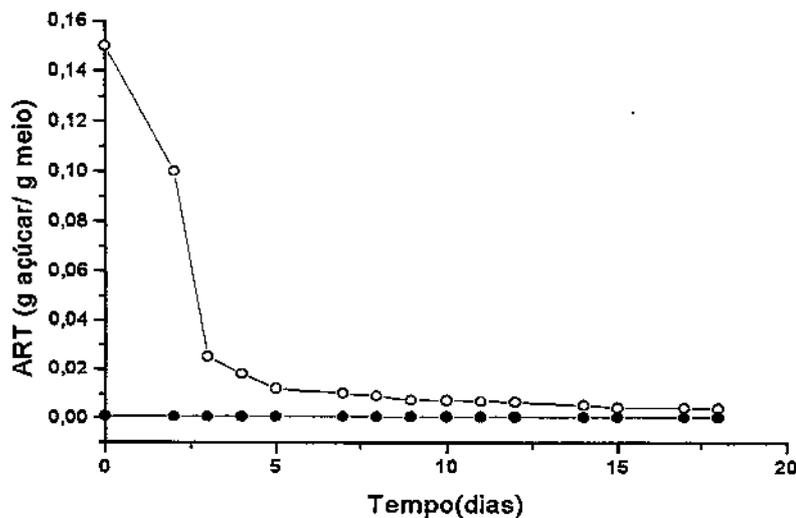


FIGURA 4.2.6. Açúcares redutores totais (ART) do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *A. niger* NRRL 3122 (• M1 - bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado).

A Figura 4.2.7 e a Figura 4.2.8 mostram os valores de pH para ambos os substratos durante a fermentação dos mesmos. Observa-se que nos quatro primeiros dias a fermentação com o bagaço não lavado fermentado por *P. italicum* IZ 1584, ocorreu uma diminuição de pH (de 4,7 para 4,5). Após o quarto dia de fermentação o pH aumentou de 4,5 para 6,7. Com o bagaço lavado houve redução do pH nos cinco primeiros dias, seguido de aumento até pH 6,2 no final da fermentação.

O aumento de pH observado foi bastante acentuado, principalmente a partir do décimo dia de fermentação, coincidindo com o aumento de atividade enzimática, o que sugere que o pH dentro de certos limites pode ser usado para monitorar a fermentação. Esse aumento durante a fermentação provavelmente ocorreu por substâncias excretadas pelo microrganismo. Para os processos que utilizaram *A. niger* NRRL 3122 os valores de pH foram mais constantes. Os valores de pH ao

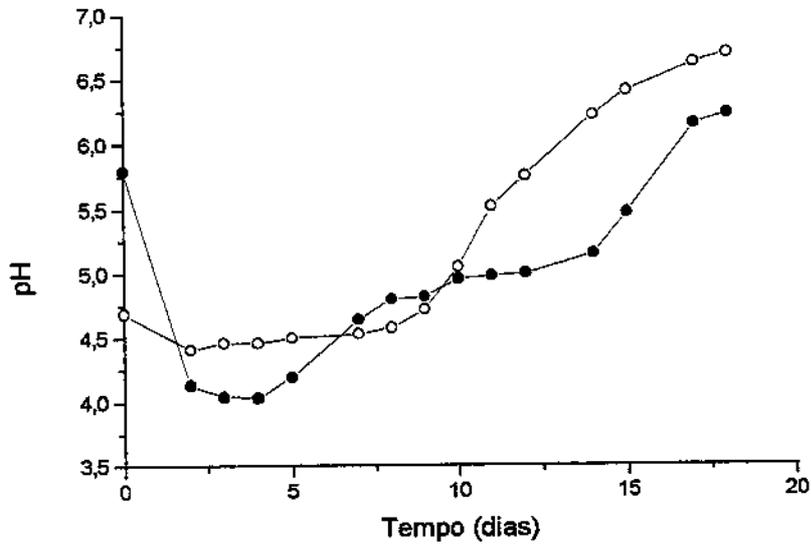


FIGURA 4.2.7. pH do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *P. italicum* IZ 1584 (● M1- bagaço lavado; ○ M2 - bagaço não lavado).

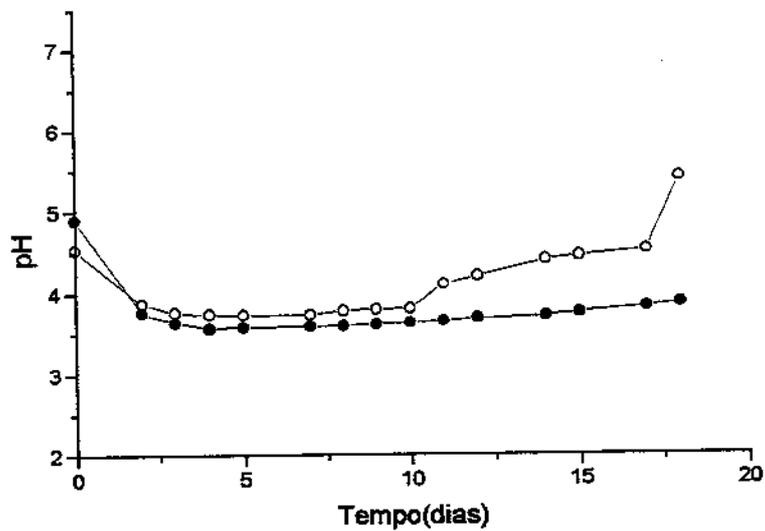


FIGURA 4.2.8. pH do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *A. niger* NRRL 3122 (● M1 - bagaço lavado; ○ M2 - bagaço não lavado).

final da fermentação foram de 3,86 para o bagaço lavado e 5,4 para o bagaço não lavado.

4.2.2. Estudo da produção de pectinase pelos fungos *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122, utilizando como substrato bagaço de laranja lavado com adição de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e não lavado.

Neste estudo foram analisadas a atividade de pectinase, produtividade, teor de ART e pH dos meios de fermentação adicionados de açúcares, para os dois fungos estudados como mostram as Figuras 4.2.9 a 4.2.16.

Pode-se observar na Figura 4.2.9 que a atividade máxima de pectinases de *P. italicum* IZ 1584 nos meios com bagaço lavado adicionados de açúcares foi de 15,02 UI/gMFU, ocorreu quando o açúcar adicionado foi a sacarose, após o décimo sexto dia de fermentação. Comparando com o bagaço não lavado, observa-se que nesse meio houve praticamente a mesma produção de enzima (15,1 UI/gMFU) no décimo quinto dia de fermentação. Os meios com glicose e frutose tiveram atividades máximas de pectinases de 6,88 UI/gMFU e 6,94 UI/gMFU, respectivamente, após o décimo nono dia de fermentação; valores 54,4 % e 54,0 % menores, comparando-se com os meios com adição de sacarose e com bagaço não lavado.

Na figura 4.2.10 pode-se observar que a atividade máxima de pectinases (1,98 UI/gMFU) de *A. niger* NRRL 3122 foi obtida com o meio que continha bagaço de laranja lavado adicionado de glicose. Com o meio adicionado de frutose obteve-se um valor de 1,55 UI/gMFU e com o meio com sacarose um valor de 1,1 UI/gMFU. Com o meio com bagaço de laranja não lavado como substrato, obteve-se o valor máximo de 9,56 UI/gMFU. Comparado com os meios aos quais foram

adicionados açúcares (glicose, frutose ou sacarose) a atividade de pectinase foi de 79%, 84% e 88,5% menores, respectivamente. A produção de pectinases por esse fungo, sofreu inibição muito mais acentuada pelos açúcares adicionados, do que observada para o *P. italicum* IZ 1584.

A doçura do suco das frutas cítricas é devido a presença dos açúcares sacarose, frutose e glicose. Em laranjas Valência da Flórida esses açúcares foram encontrados na proporção de 2:2:1 respectivamente (CURL e VEDHUIS, 1948 - apud Mc CREADY, 1977 e AMISTALDEN, 1992). Já o teor de açúcares totais, encontrado em frutas cítricas por COOK (1983), variou de 1% em alguns limões e limas e a 14% em algumas laranjas.

Como citado no item 4.1.2, o teor de açúcar determinado no bagaço foi de 19,04%, que pode ser considerado um valor alto. Entretanto, deve-se lembrar de que o bagaço contém uma pequena fração de suco não extraído, além do fato de que, algumas vezes, adiciona-se ao bagaço imediatamente antes de sua granulação (peletização) melação residual rico em açúcares (Anexo C).

Os resultados indicaram que a presença de sacarose induziu a produção de pectinases. A capacidade deste carboidrato em induzir a produção de atividades pectinolíticas foi reportada também por HENNIES (1996) em seu estudo para a produção de pectinases utilizando bagaço de laranja lavado. Ele obteve uma maior atividade quando o meio foi enriquecido com sacarose, como consequência da maior produção de massa micelial no início da fermentação. O meio com bagaço lavado como fonte de carbono apresentou atividades de pectinases menores que os meios com bagaço não lavado e com sacarose, que apresentaram maior crescimento celular. Nos estudos de ALAÑA et al. (1989) há indicação de que a fração PMGL da linhagem de *P. italicum* estudada, foi induzida pela presença de pectina no meio de cultura, sendo que na sua ausência a atividade de PMGL detectada foi desprezível.

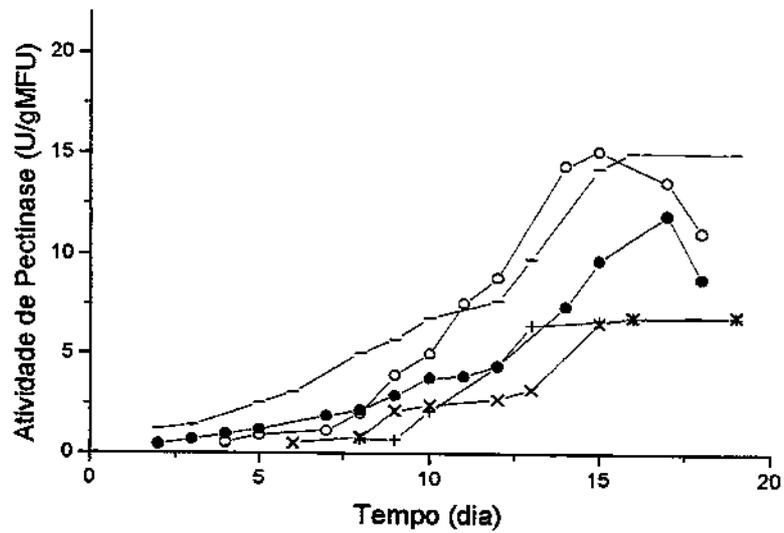


FIGURA 4.2.9. Atividade de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja (• M1 - bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado; - M3 - sacarose; + M4 - glicose; x M5 - frutose).

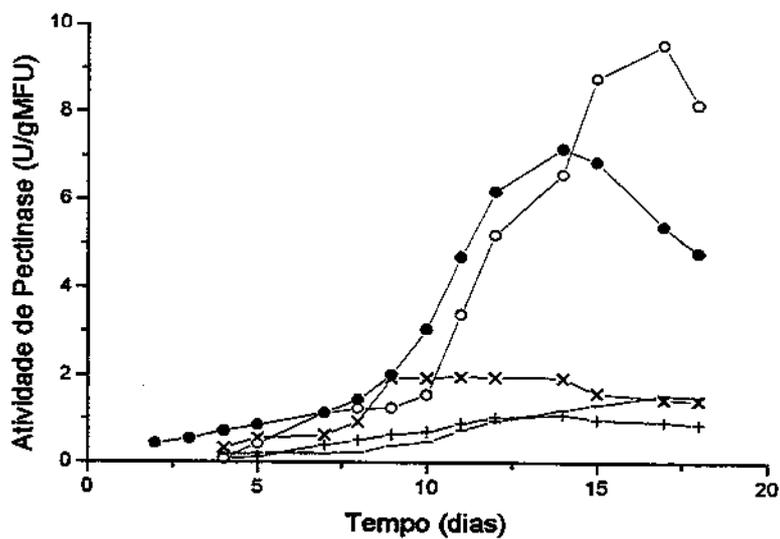


FIGURA 4.2.10. Atividade de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja (• M1 - bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado; + M3 - sacarose; x M4 - glicose; - M5 - frutose).

Nos estudos de SAID et al. (1991) sobre a produção de pectinase por *P. frequentans* em SmF, foram usados como substratos pectina e bagaço de citrus como fonte de carbono. A produção de pectinases foi induzida e o meio com pectina foi o que apresentou a maior produção. Foram testados também meios com vários outros substratos (arabinose, celulose, frutose, glicose, sacarose, galactose, maltose, manitol, manose, celobiose, xilose e trealose) e segundo estes autores, nenhum deles induziu a produção de pectinases.

BRUMANO et al. (1993) pesquisaram a produção de pectina liase constitutiva ou indutiva por *P. griseoroseum* em SmF em meios com sacarose, glicose, frutose e pectina cítrica. O meio com sacarose foi o que produziu maior atividade de pectina liase (2,46 mU ml⁻¹), seguido da pectina cítrica (0,76 mU ml⁻¹), frutose (0,40 mU ml⁻¹) e glicose (0,40 mU ml⁻¹). Na combinação desses açúcares com pectina cítrica, a sacarose também foi a que permitiu obter maior atividade enzimática.

Pela Figura 4.2.10 pode-se observar que a atividade máxima de pectinases de *A. niger* NRRL 3122 foi obtida com o meio que continha bagaço de laranja não lavado como substrato, seguido do meio com bagaço lavado. A adição de açúcares levou à redução da atividade de pectinases nos diferentes meios.

Nos estudos realizados por AGUILAR et al. (1990) foi investigada a produção da enzima constitutiva exo-pectinase de *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 em SSF, utilizando como fonte de carbono glicose, sacarose, frutose e pectina cítrica. Segundo estes autores, o crescimento do fungo no meio com glicose como única fonte de carbono foi pequeno, sugerindo ser constitutiva a enzima produzida. Durante a fermentação, observaram maior crescimento celular e consequente produção de pectinase nos meios com pectina cítrica, juntamente com frutose, glicose e sacarose, em ordem decrescente.

SOLÍS-PEREIRA et al. (1992) pesquisaram os efeitos de diferentes fontes de carbono (sacarose, glicose e ácido galacturônico) na síntese de pectinases de *A. niger* em SSF. A sacarose produziu a maior atividade total de pectinases, seguidos dos meios com glicose e ácido galacturônico, comportamento que foi também observado para produção de exo-pectinases. A produção de endo-pectinase foi maior quando havia glicose no meio, seguidos dos meios com sacarose e ácido galacturônico.

Nos experimentos realizados o fungo *P. italicum* IZ 1584 mostrou-se também mais adaptado aos meios de fermentação comparado com o fungo *A. niger* NRRL 3122. A atividade de pectinases produzidas por *P. italicum* IZ 1584 em relação a atividade das produzidas por *A. niger* NRRL 3122, foi 37% maior para o bagaço não lavado, 93% para o meio com sacarose, 40% para o bagaço lavado, 28,8% para o meio com glicose e 77,7% para o meio com frutose.

A Figura 4.2.11. e a Figura 4.2.12. mostram as curvas de produtividade de pectinases de *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122, para os meios utilizados. Observa-se que o máximo valor de produtividade para o fungo *P. italicum* IZ 1584 (1,02 U/dia) utilizando bagaço de laranja não lavado, foi maior quando comparado com os outros meios e ocorreu após o décimo quarto dia de fermentação. Para o fungo *A. niger* NRRL 3122, o valor máximo de produtividade (0,59 U/dia) ocorreu após o décimo quinto dia de fermentação com o meio contendo bagaço de laranja não lavado. Como foi observado nos valores da atividade enzimática, os valores de produtividades obtidas também foram maiores para o *P. italicum* IZ 1584 comparado com o *A. niger* NRRL 3122.

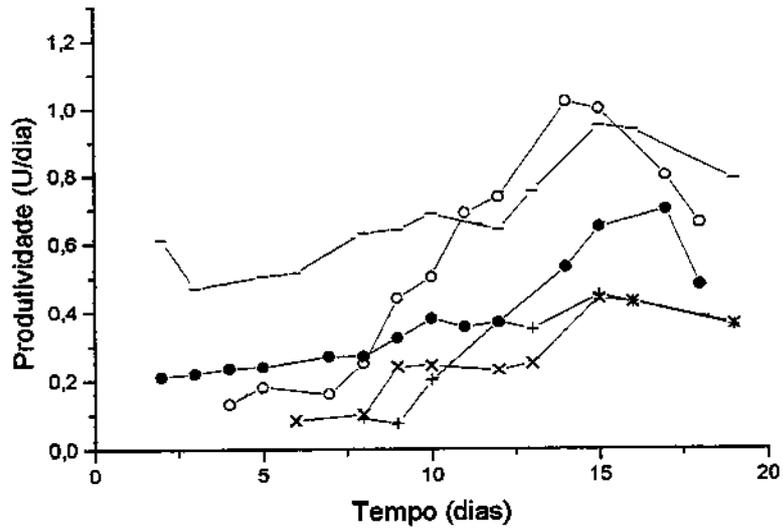


FIGURA 4.2.11. Produtividade de pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja (● M1- bagaço lavado; ○ M2 - bagaço não lavado; + M3 - sacarose; x M4 - glicose; - M5 - frutose).

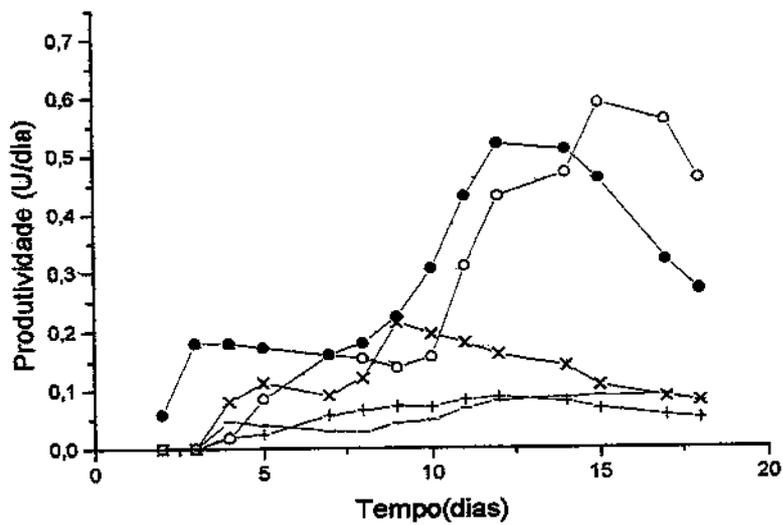


FIGURA 4.2.12. Produtividade de pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja (● M1- bagaço lavado; ○ M2 - bagaço não lavado; + M3 sacarose; x M4 - glicose; - M5 - frutose).

A Figura 4.2.13 e a Figura 4.2.14 mostram a variação da concentração de açúcares redutores totais para os diferentes meios utilizados. Pode-se observar que os meios com adição de açúcares e o meio com bagaço não lavado, no começo da fermentação apresentavam grande quantidade de açúcares, que foram metabolizados ao longo da fermentação. O *P. italicum* IZ 1584 metabolizou mais lentamente os açúcares dos substratos comparativamente ao *A. niger* NRRL 3122 e após o décimo quinto dia de fermentação, todos os substratos apresentaram praticamente a mesma concentração de açúcares remanescentes.

Como comentado anteriormente, observou-se que a partir do quinto dia de fermentação foi detectada em todos os meios a presença de pectinases. A produção de enzimas intensificou-se para ambos os fungos, quando a concentração de açúcares nos meios já não era tão alta, indicando que os fungos começaram a utilizar

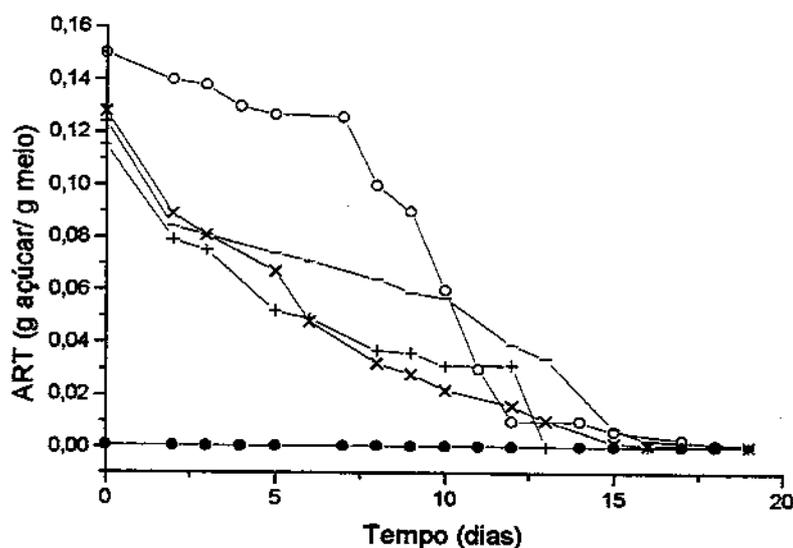


FIGURA 4.2.13. Açúcares Redutores Totais (ART) do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *P. italicum* IZ 1584 (● M1 - bagaço lavado; ○ M2 -bagaço não lavado; - M3 - sacarose; + M4 - glicose; x M5 - frutose).

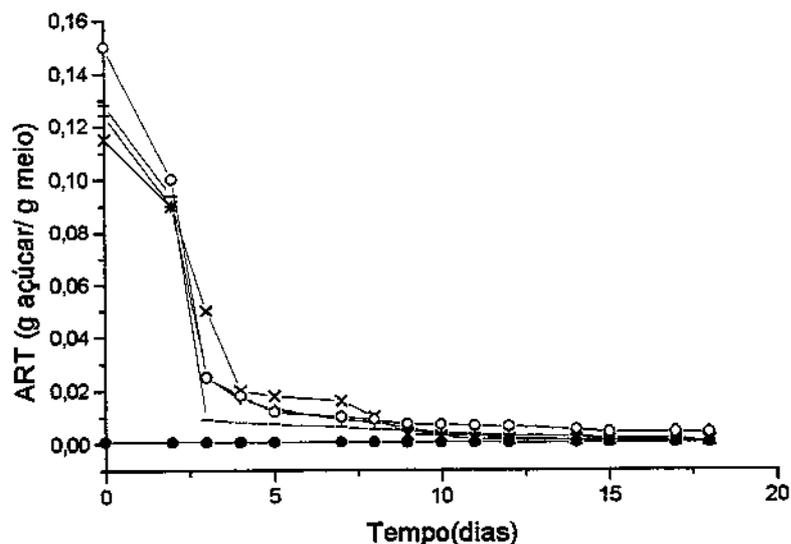


FIGURA 4.2.14. Açúcares Redutores Totais (ART) do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *A. niger* NRRL 3122 (• M1- bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado; + M3 - sacarose; x M4 - glicose; - M5 - frutose).

a pectina como substrato. Isto pode ser mais claramente observado nos resultados dos experimentos dos meios com bagaço lavado e não lavado sem adição de açúcares.

A Figura 4.2.15 e a Figura 4.2.16 nos mostram a evolução do pH das fermentações para ambos os fungos. Observa-se que nos três primeiros dias de fermentação para o *P. italicum* IZ 1584, ocorreu uma diminuição de pH e após o quarto dia até o final o pH aumentou indicando que as culturas estavam ativas. Em todos os meios o aumento de pH observado foi bastante acentuado. Os meios com adição de açúcares apresentaram valores de pH maiores se comparados com os meios com bagaço lavado e não lavado, sendo que o meio com sacarose foi o que atingiu maior valor de pH (7,67). Para o *A. niger* NRRL 3122 o pH permaneceu constante após o segundo dia de fermentação, mas no meio com bagaço não lavado

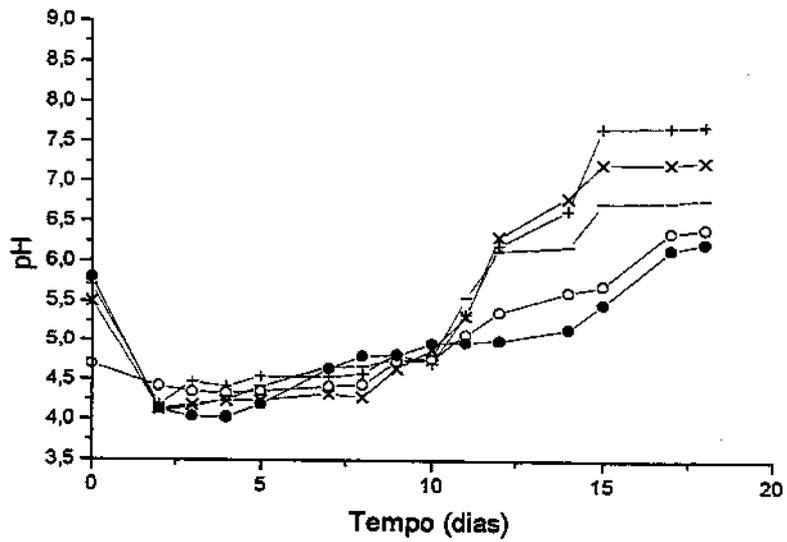


FIGURA 4.2.15. pH do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *P. italicum* IZ 1584 (• M1 - bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado; + M3 - sacarose; x M4 - glicose; - M5 - frutose).

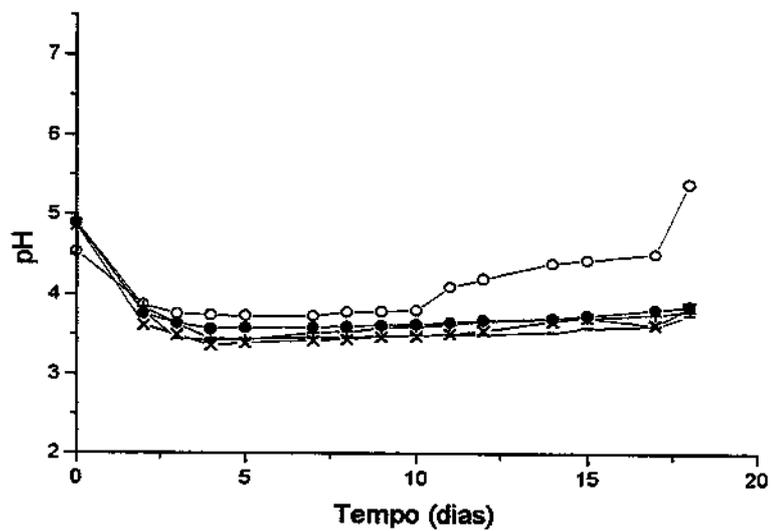


FIGURA 4.2.16. pH do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *A. niger* NRRL 3122 (• M1 - bagaço lavado; o M2 - bagaço não lavado; + M3 - sacarose; x M4 - glicose; - M5 - frutose).

o pH comportou-se de maneira variável, chegando a um valor máximo de pH de 5,4. Os outros meios não chegaram a atingir valores de pH maiores de 4,0.

4.2.3. Estudo da produção de pectinase pelos fungos *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122 utilizando como substrato misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Neste estudo foram analisados a atividade de pectinase, produtividade, teor de ART e pH dos meios de fermentação para os dois fungos estudados, como mostram as Figuras 4.2.17 a 4.2.24.

A Figura 4.2.17 e a Figura 4.2.18 mostram a atividade de pectinase para os dois fungos utilizados. Pode-se observar que para o fungo *P. italicum* IZ 1584 a atividade máxima de pectinase obtida foi de 20,72 UI/gMFU após o décimo sexto dia de fermentação, quando utilizou-se o meio com 75% de bagaço lavado e 25% de bagaço não lavado (M6) como substrato. No meio com 25% de bagaço lavado e 75% de bagaço não lavado (M8), o valor de atividade máxima de pectinase foi de 14,64 UI/gMFU, após o décimo sexto dia de fermentação, 30% menor que valor obtido com o meio M6. Com o meio com 50% de bagaço lavado e 50% de bagaço não lavado (M7) o valor de atividade máxima, após o décimo sexto dia de fermentação foi de 10,44 UI/gMFU, 50% menor que o valor máximo obtido com o meio M6.

Os meios com maiores quantidades de bagaço não lavado apresentaram as menores atividade de pectinases, após o quarto dia de fermentação, reforçando que a presença de açúcares no substrato, inibe a atividade de pectinase nos primeiros dias de fermentação, conforme discutido nos itens 4.2.1 e 4.2.2..

Comparando-se a produção da enzima nos meios com bagaço lavado (M1) e não lavado (M2), observa-se que as atividades de pectinase dos mesmos foram 42% e 27% menores, respectivamente, comparadas ao meio onde houve a mistura de 75% do bagaço lavado com 25% do não lavado (M6).

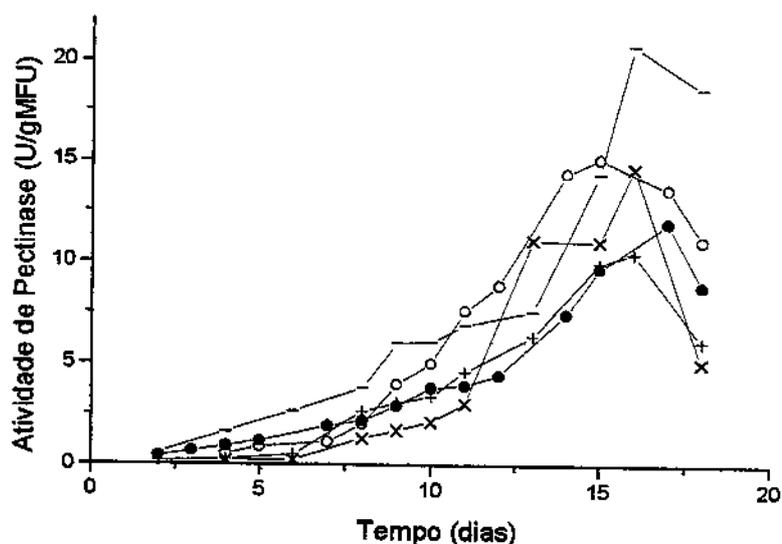


FIGURA 4.2.17. Atividade de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja (● M1 -bagaço lavado; ○ M2 -bagaço não lavado; - M6 -75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 -50% bagaço não lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 -25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

A atividade de pectinases de *P. italicum* IZ 1584 do ensaio com adição de sacarose (M3) ao substrato (maior atividade obtida nos experimentos anteriores) foi 27,5% menor que a atividade de pectinase do meio M6, podendo-se concluir que este meio foi o melhor para a produção de pectinases, em relação a todos os demais meios estudados.

A Figura 4.2.18 mostra a atividade de pectinase de *A. niger* NRRL 3122, em meios compostos por misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado. Pode-se

observar que o valor máximo de atividade de pectinase (12,2 UI/gMFU) foi obtido com o meio M8 após o décimo sétimo dia de fermentação. No meio M6, obteve-se atividade de 9,25 UI/gMFU, após o décimo quarto dia de fermentação, 24% menor em relação ao meio M8. O meio M7, apresentou menor atividade de pectinase com apenas 2,27 UI/gMFU, 81,4% menor que o meio M8.

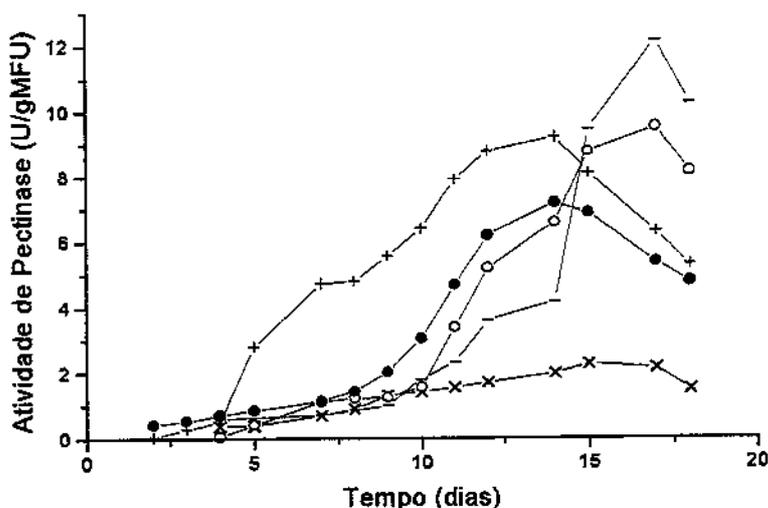


FIGURA 4.2.18. Atividade de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja (• M1-bagaço lavado); o M2 -bagaço não lavado; + M6 -75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; x M7 -50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; - M8 -25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

No meio com bagaço lavado (M1) obteve-se valor de atividade enzimática 41% e 22% menores que os meios M8 e M6, respectivamente, e a atividade obtida com bagaço não lavado (M2) foi 21,64% menor que a obtida com o meio M8 e igual ao meio M6, quando foi utilizado *P. italicum* IZ 1584. Os meios adicionados de açúcares (Figura 4.2.9 e Figura 4.2.10), apresentaram valores de atividade de pectinases inferiores a todos os meios com bagaço lavado, bagaço não lavado e suas misturas. Exceto o meio com adição de sacarose quando utilizou-se o fungo *P. italicum* IZ 1584.

A Figura 4.2.19 e a Figura 4.2.20 mostram os valores da produtividade obtidos em fermentações de meios com misturas de bagaço lavado e não lavado por *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122. O valor máximo de produtividade obtido com o *P. italicum* IZ 1584 utilizando o meio M6, ocorreu após o décimo sexto dia de fermentação. Para os meios M7 e M8, ocorreram após o décimo quinto e décimo sexto dia de fermentação, respectivamente.

Para o fungo *A. niger* NRRL 3122 a máxima produtividade obtida ocorreu após o décimo quarto dia para o meio M6. Para os meios M7 e M8 ocorreu após o décimo sétimo e décimo oitavo dia, respectivamente. Observa-se que os valores de produtividade obtidos foram maiores quando utilizou-se *P. italicum* IZ 1584.

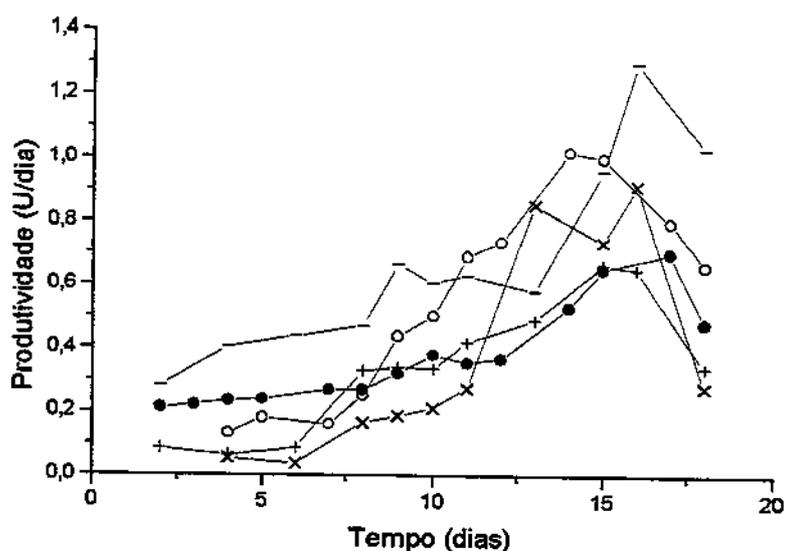


FIGURA 4.2.19. Produtividade de pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja (● M1 - bagaço lavado; ○ M2 - bagaço não lavado; - M6 - 75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 - 50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 - 25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

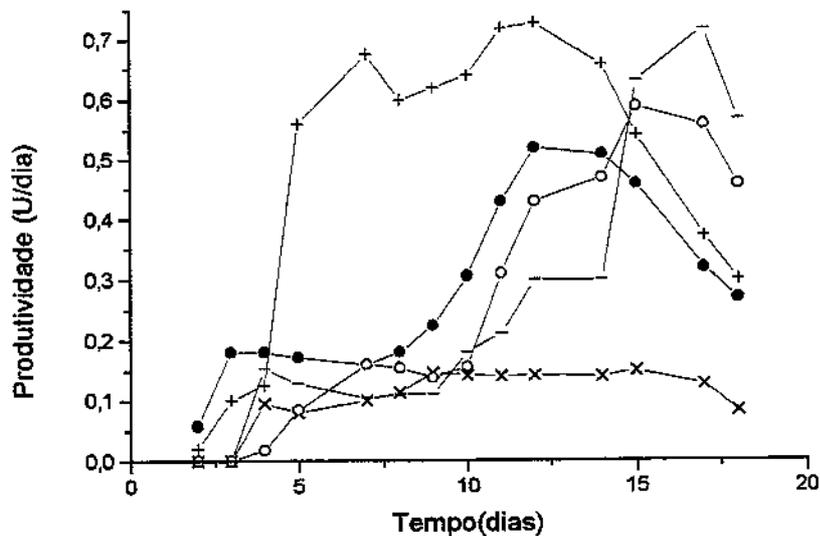


FIGURA 4.2.20. Produtividade de pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja (● M1 -bagaço lavado; o M2 -bagaço não lavado; - M6 - 75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 - 50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 - 25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

Pela Figura 4.2.21 e Figura 4.2.22 pode-se observar a variação da concentração de açúcares redutores totais nos meios de cultura para os dois fungos utilizados neste trabalho. Na fermentação com *P. italicum* IZ 1584, observou-se que os açúcares existentes nos meios M6, M7 e M8 foram metabolizados de forma rápida. No segundo dia de fermentação foram observadas quantidades mínimas de ART, exceto o meio com bagaço não lavado. Os maiores valores de atividade de pectinase foram obtidos apenas após o décimo dia (Figuras 4.2.17 e 4.2.18). O metabolismo dos açúcares pelo *P. italicum* IZ 1584 ocorreu de forma mais lenta comparado ao *A. niger* NRRL 3122 pois, somente após o quinto dia é que observam-se valores equivalentes de ART. Após o décimo dia de fermentação a concentração de açúcares em todos os substratos estavam praticamente iguais. A partir deste dia também observou-se aumento na produção de pectinases.

Comparando-se estes resultados com os obtidos nos meios adicionados de açúcares (sacarose, glicose ou frutose), pôde-se observar que o fungo *P. italicum* IZ 1584, metabolizou os açúcares disponíveis mais rapidamente. Nos experimentos utilizando os meios M3, M4 e M5 somente após o décimo quinto dia de cultivo observou-se uma concentração baixa de açúcares em todos os meios de fermentação. O fungo *A. niger* NRRL 3122, metabolizou os açúcares mais rapidamente quando comparado aos experimentos utilizando os meios M3, M4 e M5.

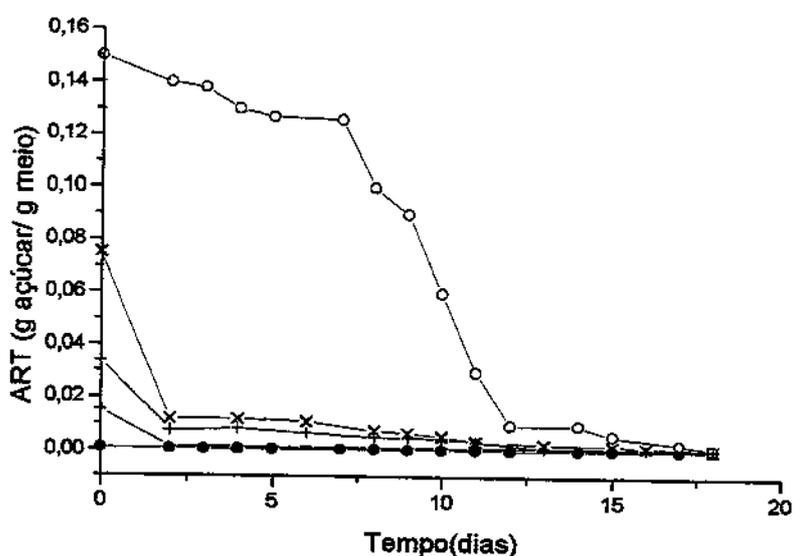


FIGURA 4.2.21. Açúcares Redutores Totais (ART) do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *P. italicum* IZ 1584 (● M1 -bagaço lavado; ○ M2 -bagaço não lavado; - M6 -75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 -50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 -25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

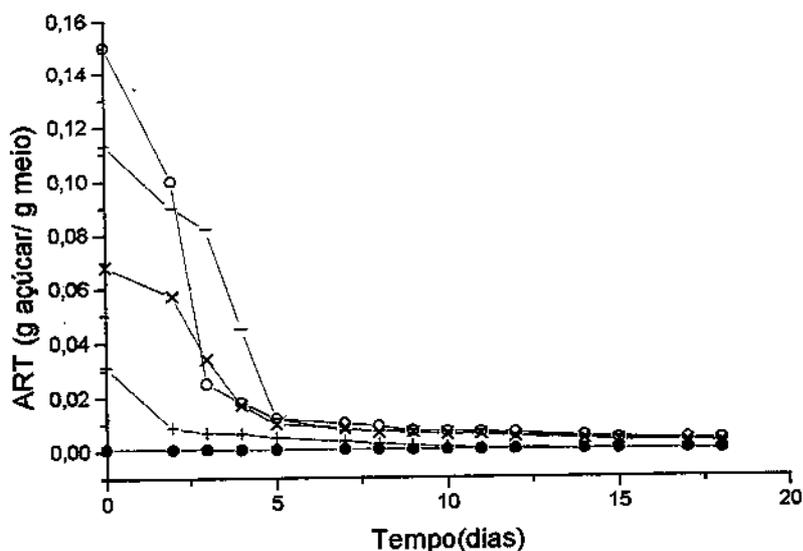


FIGURA 4.2.22. Açúcares Redutores Totais (ART) do meio semi-sólido de bagaço de laranja fermentado por *A. niger* NRRL 3122 (● M1 -bagaço lavado; ○ M2 -bagaço não lavado; - M6 -75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 -50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 -25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

A Figura 4.2.23 e a Figura 4.2.24 mostram os valores de pH dos meios de cultivo para os dois fungos *P. italicum* IZ 1584 e *A. niger* NRRL 3122, respectivamente. Os valores de pH para o *P. italicum* IZ 1584 sofreram um decréscimo nos primeiros dias de fermentação, voltando a aumentar após o quinto dia, atingindo valor máximo de pH 7,7 para o meio M8. Para o meio M7 e o meio M6, os valores máximos de pH apresentaram pequenos aumentos durante toda a fermentação. O valor máximo para o meio M8, foi pH 4,34, para o meio M7 foi pH 3,87 e para o meio M6, pH de 4,28.

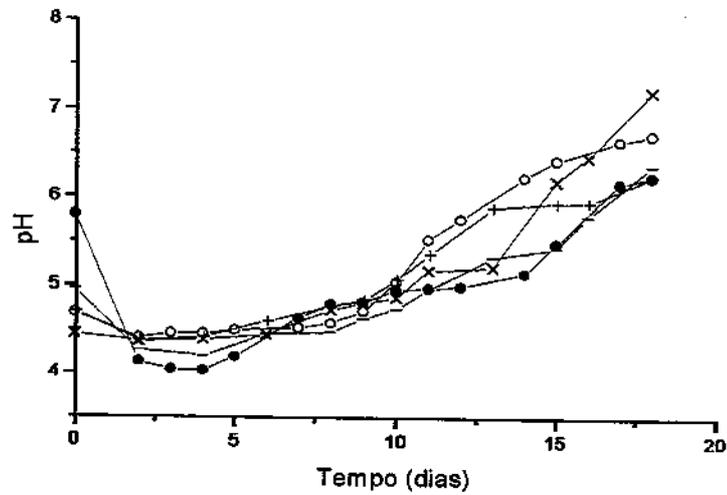


FIGURA 4.2.23. pH do meio semi-sólido do bagaço de laranja fermentado por *P. italicum* IZ 1584 (● M1 -bagaço lavado; ○ M2 -bagaço não lavado; - M6-75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 -50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 -25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

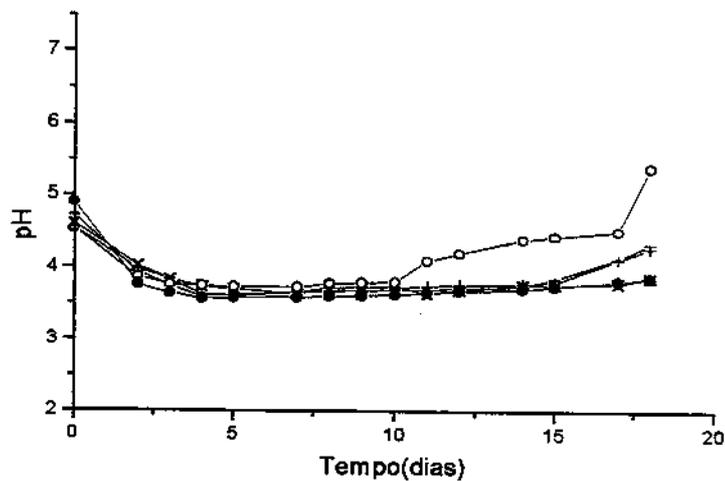


FIGURA 4.2.24. pH do meio semi-sólido do bagaço de laranja fermentado por *A. niger* NRRL 3122 (● M1-bagaço lavado; ○ M2 -bagaço não lavado; - M6 -75% bagaço lavado e 25% bagaço não lavado; + M7 -50% bagaço lavado e 50% bagaço não lavado; x M8 -25% bagaço lavado e 75% bagaço não lavado).

A realização deste trabalho, contribuiu para o desenvolvimento do processo de SSF, no qual pôde-se demonstrar que o subproduto usado como substrato para a SSF (bagaço de laranja industrializado), foi bastante eficaz para a produção de pectinases. Os valores de atividades dessas enzimas (20,72 UI/gMFU) encontrados, foram superiores (média de 80% maiores) aos valores citados em literatura para experimentos semelhantes utilizando os subprodutos cascas de limões (MALDONADO et al., 1986), bagaço de laranja (HENNIES, 1996) e farelo de trigo (GHILDYAL et al., 1981), entre outros. Por outro lado, o valor máximo encontrado neste trabalho, foi 37% menor, comparado ao estudo de ANTIER et al. (1993), onde foi utilizado o subproduto da polpa de café como substrato.

5. CONCLUSÕES

O fungo *P. italicum* IZ 1584 produziu maior quantidade de pectinases que o fungo *A. niger* NRRL 3122 em meios contendo bagaço de laranja.

O bagaço de laranja não lavado foi mais efetivo como substrato para a produção de pectinases. A concentração de açúcares pré-existentes no bagaço permitiu maior crescimento micelial e maior produção de enzimas no final da fermentação, em relação ao bagaço lavado.

Nos meios constituídos por bagaço lavado e não lavado adicionados de açúcares (sacarose, glicose ou frutose), o meio com sacarose foi o que propiciou maior produção de enzimas pectinolíticas, quando foi utilizado o fungo *P. italicum* IZ 1584.

Os meios com bagaço não lavado e com bagaço lavado adicionado de sacarose, produziram o mesmo valor máximo de atividade de pectinases por *P. italicum* IZ 1584.

O fungo *A. niger* NRRL 3122 não mostrou crescimento e produção de enzimas pectinolíticas satisfatórios em quaisquer dos meios adicionados de açúcares.

Os pH dos meios diminuíram no início da fermentação, porém voltando a aumentar no final, quando a produção de pectinases também aumentou. Os valores de pH, foram maiores para o bagaço não lavado.

Os açúcares redutores totais (ART) foram consumidos rapidamente pelo fungo *A. niger* NRRL 3122, nos primeiros cinco dias de cultivo. O fungo *P. italicum*

IZ 1584 metabolizou lentamente os açúcares redutores (ART) ao longo da fermentação.

O meio com mistura de 75% de bagaço lavado e 25% de bagaço não lavado (M6) comparado com os outros meios utilizados foi o que levou ao maior valor de atividade de pectinases (20,72 UI/gMFU), quando foi utilizado o fungo *P. italicum* IZ 1584.

Os resultados obtidos (Figura 4.2.9 e Figura 4.2.10) mostraram que em caso de se utilizar bagaço de laranja para produção de pectinases, deve-se processá-lo de forma a evitar a inversão da sacarose, uma vez que este açúcar permitiu obter maior atividade enzimática, enquanto que a glicose e frutose inibiram a produção da enzima.

Comparando este trabalho com outros autores, podemos concluir que a sacarose é um ótimo carboidrato para a produção de pectinases de *P. italicum* IZ 1584, quando usada como fonte de carbono em meios contendo pectina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Biotecnology**, v. 43, n. 5, p. 808-814, Jan 1995.
- AGUILAR, G.; HUITRÓN, C. Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp CH-Y-1043 on different carbon source. **Biotecnology 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, L.; 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.
- 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 coffee pulp. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 15, n.3, p.254-260, 1993.

ATKINSON, B. Biochemical Reactors. Pion Limited, London, 1984, 267 pp.

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.

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.

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseo-roseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9, p. 225-228, 1993.

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

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.

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.

DURAND, A., DE LA BROISE, D., BLACHÈRE, H. Laboratory scale biorreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, v.8, p.59-66, 1988.

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 polyssacharides. In: **HOCKENHULL, D. J. D.** (ed.) **Progress in industrial microbiology**. London: Churchill Livingstone, 1974. v. 13, p. 59-119.

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.

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.

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).

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 of 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.

ISMAIL, A. S. Utilization of Orange Peels for the Production of Multienzyme Complexes by Some Fungal Strains. **Process Biochemistry**. Egyto, 1996. v. 31, n. 7, p. 645-650.

KERTESZ, Z. I. The pectic substances. New York: Interscience, 1951. 628 p.

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.; VINEGRA-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.

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.

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. **Sciences Des Aliments.** v. 9, p. 101-110, set. 1989.

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. L.; 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.

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.

ORIOLO, E.; SCETTINO 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.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 26, n. 6, p. 355-366, Dec., 1991.

PEPPLER, H. J.; REED, G. Enzymes in food and feed processing. In: KENNEDY, J. F. (ed.) **Enzyme Technology**. Weinheim: VCH, 1987. v. 7a, cap. 11, p. 581-586. (Biotechnology).

PLATT, W. C.; POSTON, A. L. U.S. Patent 3.085.887 (1962) In: FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. **Process Biochemistry**, London, v. 7, n. 8, p. 13-17, Aug., 1972.

RAIMBAULT, M. & ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European J. Appl. Microbiol.**, v.9, p.199-209, 1980.

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.

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.

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.

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.

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.

SCHWIMMER, S. Role 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.

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.

SILMAN, R. W., CONWAY, H. F., ANDERSON, R. A., BAGLEY, E.B. Production of aflatoxin in corn by a large-scale 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.

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 1992.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19, 1952.

TENDERGY, R.P. Solid state fermentation. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.4, p.96-9.1985.

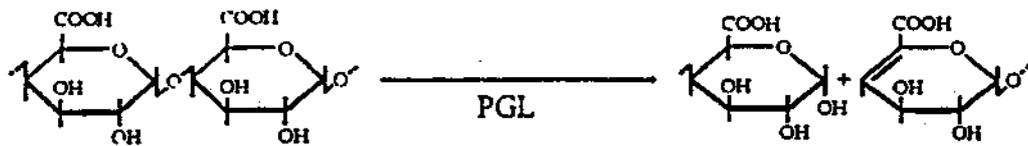
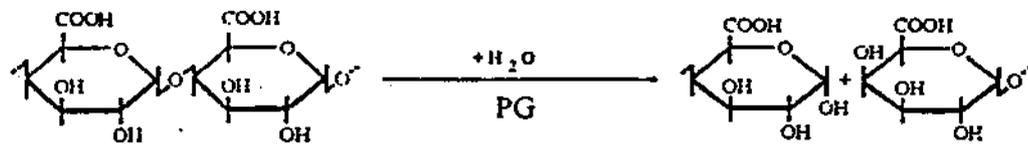
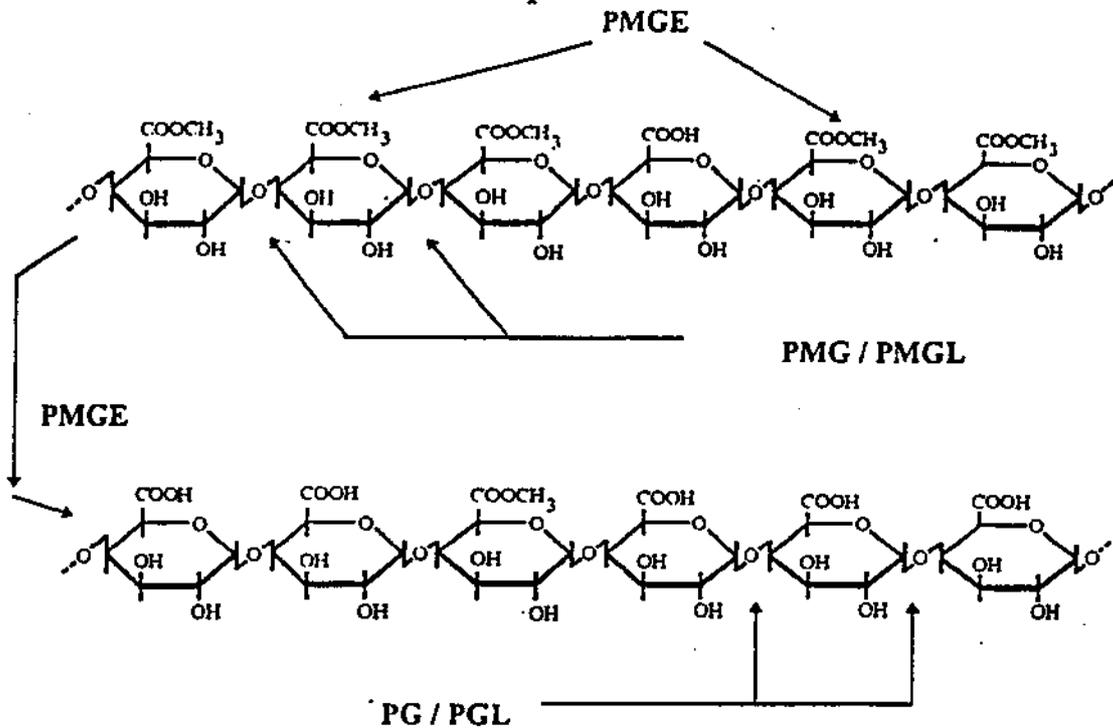
THIEMANN, J.E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referências às celulasas. In: SEMINÁRIO DE "HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS", 2, 1985, Maringá. Anais...Maringá, 1985. p.1077-31.

TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. **Biotechnology and Bioeng. Symp.**, n.6, p. 207-19, 1976.

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.

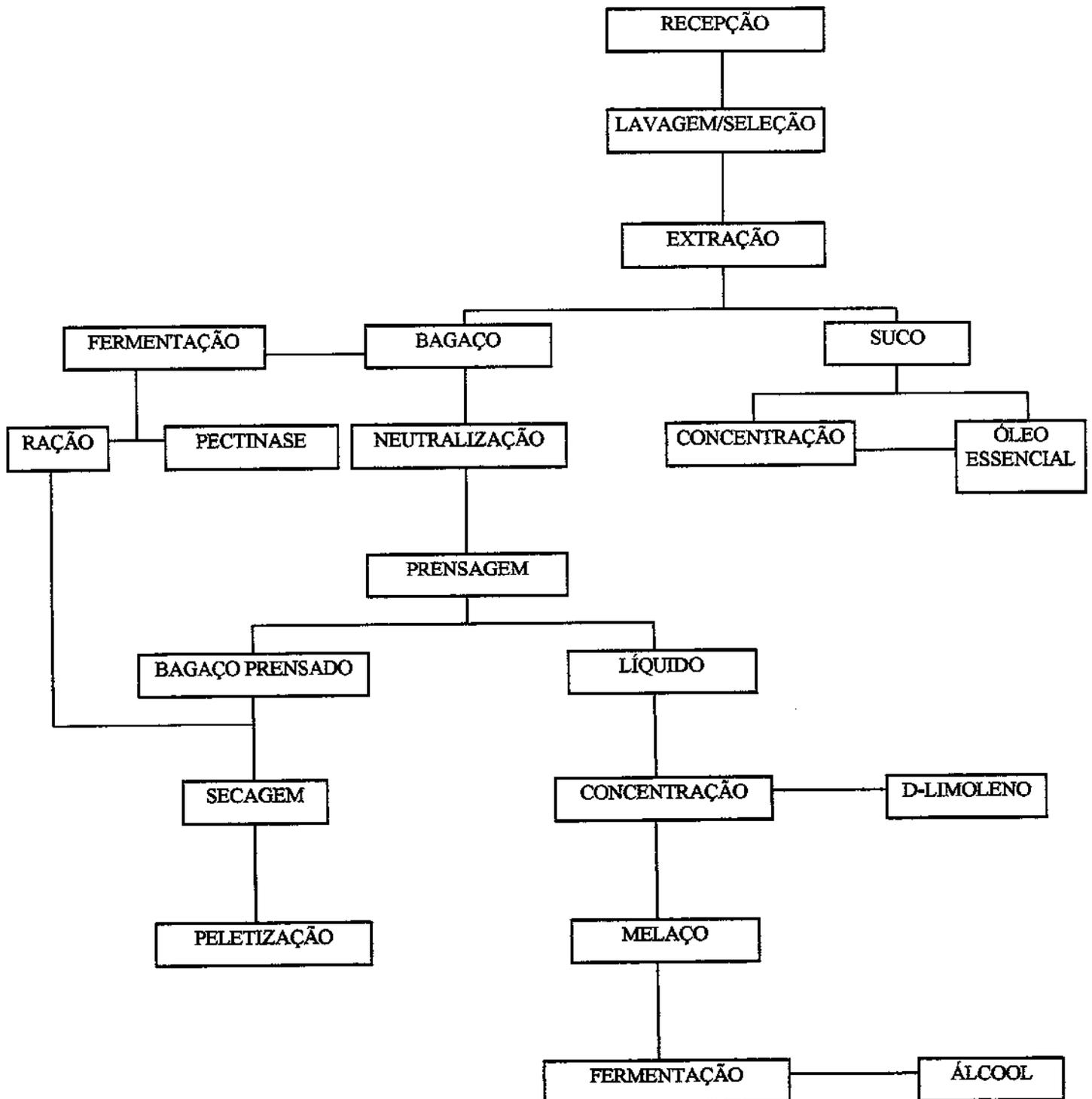
7. ANEXOS

ANEXO A - Ação das enzimas pectinolíticas.



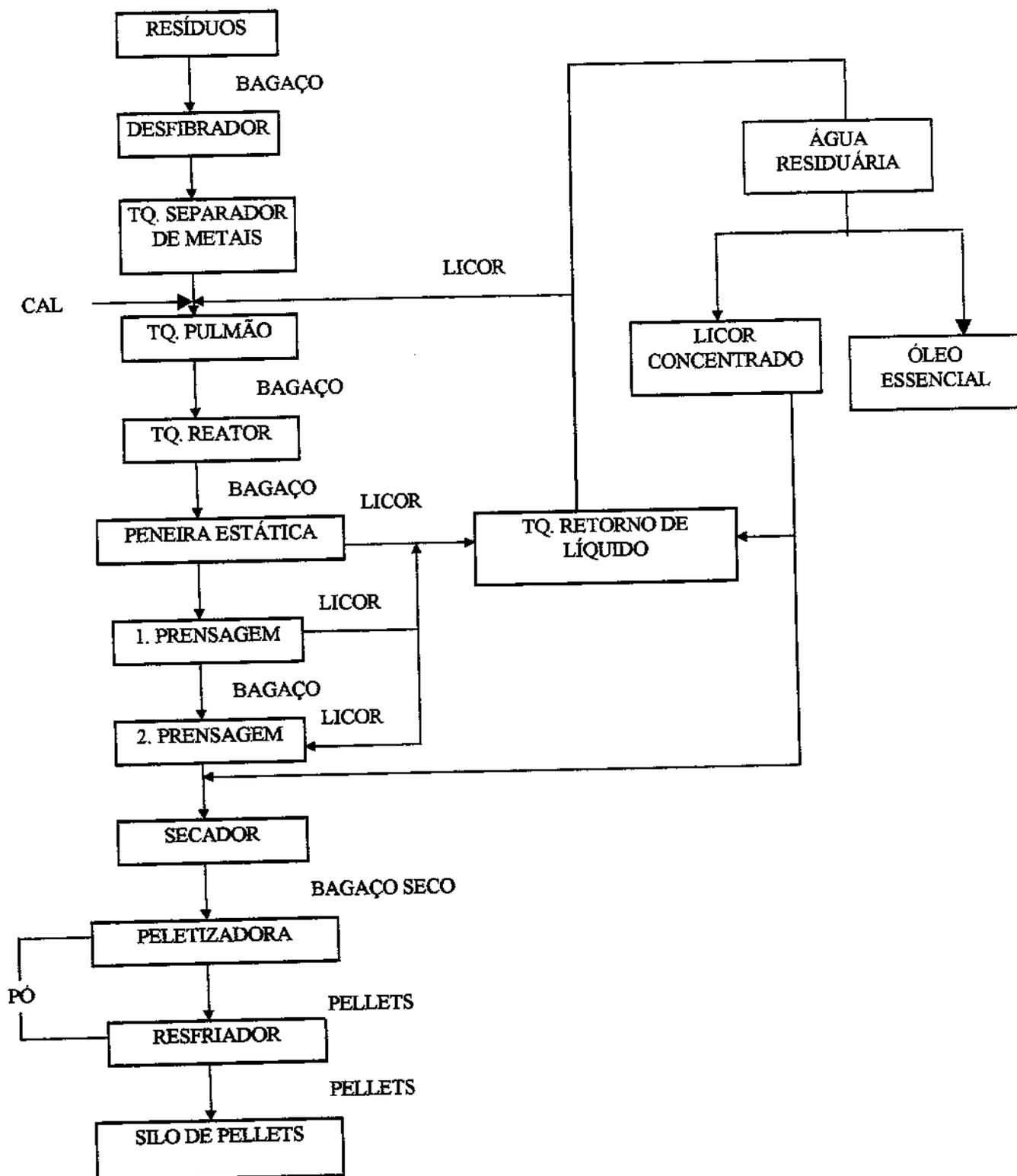
(Fonte : SCHWIMMER, 1981)

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 D1 : Atividade de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

NC - não calculado.

Tempo (dias)	Atividade de Pectinase de <i>P. italicum</i> IZ 1584 (UI/gMFU)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	0,42	-	1,22	-	-	0,564	0,168	-
3	0,66	-	1,41	-	-	NC	NC	-
4	0,935	0,52	NC	-	-	1,62	0,252	0,21
5	1,19	0,9	2,52	-	-	NC	NC	NC
6	NC	NC	3,08	-	0,5	2,64	0,51	0,22
7	1,9	1,13	NC	-	NC	NC	NC	NC
8	2,17	2,02	5,04	0,71	0,81	3,78	2,64	1,32
9	2,91	3,97	5,76	0,67	2,14	6,0	3,06	1,7
10	3,8	5,02	6,86	2,12	2,43	6,06	3,36	2,1
11	3,91	7,57	NC	NC	NC	6,09	4,59	3,02
12	4,42	8,83	7,68	4,41	2,71	NC	NC	NC
13	NC	NC	9,8	6,48	3,24	7,56	6,34	11,1
14	7,42	14,39	NC	6,7	NC	NC	NC	NC
15	9,7	15,1	14,25	NC	6,6	14,4	9,96	11,04
16	NC	NC	15,02	6,87	6,9	20,76	10,44	14,64
17	11,94	13,59	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	8,8	11,08	NC	NC	NC	18,6	5,04	11,58
19	NC	NC	14,99	6,88	6,94	NC	NC	NC

TABELA D2 : Atividade de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	Atividade de Pectinase de <i>A. niger</i> NRRL 3122 (UI/gMFU)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	0,424	-	-	-	-	0,04	-	-
3	0,54	-	-	-	-	0,3	-	-
4	0,72	0,07	0,08	0,32	0,183	0,5	0,38	0,61
5	0,86	0,422	0,12	0,56	0,2	2,8	0,4	0,64
7	1,13	1,13	0,39	0,62	0,2	4,73	0,71	0,73
8	1,44	1,23	0,51	0,93	0,22	4,8	0,9	0,87
9	2,02	1,25	0,64	1,94	0,38	5,57	1,31	1,0
10	3,06	1,56	0,7	1,95	0,47	6,4	1,42	1,8
11	4,7	3,4	0,9	1,98	0,74	7,94	1,55	2,32
12	6,2	5,2	1,03	1,96	0,953	8,8	1,7	3,6
14	7,2	6,6	1,1	1,95	1,21	9,25	1,98	4,2
15	6,9	8,8	0,99	1,6	1,32	8,14	2,27	9,5
17	5,4	9,56	0,93	1,46	1,55	6,34	2,16	12,2
18	4,8	8,2	0,875	1,42	1,51	5,33	1,5	10,3

TABELA D3 : Produtividade de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	Produtividade de Pectinase de <i>P. italicum</i> IZ 1584 (U/dia)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	0,21	-	0,61	-	-	0,282	0,084	-
3	0,22	-	0,47	-	-	NC	NC	-
4	0,234	0,13	NC	-	-	0,405	0,063	0,0525
5	0,238	0,18	0,504	-	-	NC	NC	NC
6	NC	NC	0,513	-	0,083	0,44	0,085	0,037
7	0,27	0,16	NC	-	NC	NC	NC	NC
8	0,27	0,25	0,63	0,089	0,1	0,47	0,33	0,165
9	0,323	0,44	0,64	0,075	0,24	0,666	0,34	0,188
10	0,38	0,502	0,686	0,212	0,243	0,606	0,336	0,21
11	0,355	0,688	NC	NC	NC	0,63	0,42	0,275
12	0,368	0,736	0,64	0,37	0,23	NC	NC	NC
13	NC	NC	0,754	0,5	0,25	0,58	0,49	0,854
14	0,53	1,02	NC	0,45	NC	NC	NC	NC
15	0,65	1	0,95	NC	0,44	0,96	0,664	0,736
16	NC	NC	0,94	0,43	0,43	1,3	0,65	0,915
17	0,7	0,799	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	0,48	0,66	NC	NC	NC	1,03	0,34	0,28
19	NC	NC	0,79	0,36	0,365	NC	NC	NC

TABELA D4 : Produtividade de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	Produtividade de Pectinase de <i>A. niger</i> NRRL 3122 (U/dia)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	0,212	-	-	-	-	0,02	-	-
3	0,18	-	-	-	-	0,1	-	-
4	0,18	0,0175	0,02	0,08	0,046	0,125	0,095	0,153
5	0,172	0,0844	0,024	0,112	0,04	0,56	0,08	0,128
7	0,16	0,154	0,056	0,09	0,03	0,67	0,10	0,104
8	0,18	0,16	0,064	0,12	0,0275	0,6	0,113	0,11
9	0,224	0,138	0,071	0,215	0,042	0,62	0,146	0,111
10	0,306	0,156	0,07	0,195	0,047	0,64	0,142	0,18
11	0,43	0,31	0,082	0,18	0,067	0,72	0,14	0,211
12	0,52	0,43	0,086	0,16	0,08	0,73	0,142	0,3
14	0,51	0,47	0,079	0,14	0,086	0,66	0,14	0,3
15	0,46	0,59	0,066	0,107	0,088	0,543	0,15	0,633
17	0,32	0,56	0,055	0,086	0,09	0,373	0,127	0,72
18	0,27	0,46	0,05	0,08	0,079	0,3	0,083	0,57

TABELA D5 : Teor de Açúcares Redutores (ART) de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	ART de Pectinase de <i>P. italicum</i> IZ 1584 (g açúcar/g meio)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	0,00064	0,14	0,084	0,079	0,089	0,0014	0,007	0,012
3	0,00064	0,138	0,081	0,075	0,081	NC	NC	NC
4	0,00052	0,13	NC	NC	NC	0,00139	0,0083	0,012
5	0,00045	0,127	0,074	0,052	0,067	NC	NC	NC
6	NC	NC	0,0,071	0,049	0,048	0,0013	0,0067	0,011
7	0,00044	0,126	NC	NC	NC	NC	NC	NC
8	0,00044	0,019	0,064	0,037	0,037	0,00127	0,0052	0,0077
9	0,00039	0,017	0,059	0,036	0,028	0,00126	0,0051	0,0069
10	0,00035	0,015	0,057	0,031	0,022	0,00121	0,0046	0,0056
11	0,00033	0,015	NC	NC	NC	0,00119	0,0038	0,0037
12	0,00032	0,013	0,039	0,031	0,016	NC	NC	NC
13	NC	NC	0,034	0,0003	0,0103	0,00115	0,0012	0,0027
14	0,00029	0,012	NC	0,00028	NC	NC	NC	NC
15	0,00029	0,00107	0,007	NC	0,00174	0,00107	0,0011	0,0023
16	NC	NC	0,0028	0,00021	0,00074	0,0010	0,00087	0,0015
17	0,00025	0,001	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	0,00025	0,0009	NC	NC	NC	0,0009	0,0005	0,0008
19	NC	NC	0,00092	0,00013	0,00058	NC	NC	NC

TABELA D6 : Teor de Açúcares Redutores (ART) de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	ART de Pectinase de <i>A. niger</i> NRRL 3122 (g açúcar/g meio)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	0,0065	0,135	0,09	0,1	0,094	0,02	0,057	0,098
3	0,0064	0,025	0,025	0,09	0,009	0,0087	0,034	0,09
4	0,0064	0,018	0,017	0,05	0,079	0,0067	0,017	0,082
5	0,0053	0,012	0,013	0,016	0,0072	0,0064	0,01	0,045
7	0,004	0,01	0,009	0,02	0,006	0,005	0,0085	0,012
8	0,0017	0,009	0,0079	0,018	0,0054	0,0035	0,0069	0,0075
9	0,0015	0,0073	0,056	0,01	0,005	0,0025	0,0067	0,0073
10	0,0012	0,007	0,0039	0,0034	0,0033	0,002	0,0062	0,0072
11	0,001	0,0067	0,0034	0,003	0,003	0,0013	0,0061	0,007
12	0,0009	0,0064	0,003	0,00182	0,0021	0,0009	0,005	0,0068
14	0,00085	0,0052	0,0027	0,0016	0,00136	0,0007	0,0043	0,0054
15	0,00068	0,0041	0,002	0,0014	0,0011	0,0005	0,0035	0,005
17	0,00016	0,0041	0,00196	0,0014	0,09	0,0004	0,0032	0,0048
18	0,00014	0,0039	0,0019	0,0012	0,001	0,00028	0,003	0,003

TABELA D7 : pH de Pectinase de *P. italicum* IZ 1584 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	pH de Pectinase de <i>P. italicum</i> IZ 1584							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	4,13	4,41	4,18	4,13	4,10	4,27	4,38	4,37
3	4,04	4,46	4,47	4,48	4,16	NC	NC	NC
4	4,03	4,46	NC	NC	NC	4,42	4,42	4,39
5	4,19	4,5	4,42	4,23	4,24	NC	NC	NC
6	NC	NC	4,54	4,24	4,42	4,46	4,6	4,45
7	4,64	4,53	NC	NC	NC	NC	NC	NC
8	4,8	4,58	4,54	4,32	4,66	4,48	4,78	4,73
9	4,82	4,72	4,58	4,28	4,76	4,63	4,85	4,81
10	4,96	5,05	4,7	4,64	4,67	4,75	5,08	4,88
11	4,98	5,52	NC	NC	NC	4,97	5,36	5,18
12	5,0	5,75	4,83	4,89	4,77	NC	NC	NC
13	NC	NC	5,34	5,32	4,55	5,32	5,88	5,22
14	5,15	6,22	NC	6,31	NC	NC	NC	NC
15	5,47	6,41	6,2	NC	6,13	5,43	5,93	6,18
16	NC	NC	6,64	5,8	5,18	5,78	5,94	6,45
17	6,15	6,63	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	6,23	6,7	NC	NC	NC	6,35	6,23	7,77
19	NC	NC	7,67	7,22	6,73	NC	NC	NC

TABELA D8 : pH de Pectinase de *A. niger* NRRL 3122 cultivado em bagaço de laranja lavado, bagaço de laranja não lavado, bagaço lavado adicionado de açúcares (sacarose, glicose ou frutose) e misturas de bagaço de laranja lavado e não lavado em porcentagens diferentes.

Tempo (dias)	pH de Pectinase de <i>A. niger</i> NRRL 3122							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2	3,76	3,87	3,84	3,61	3,77	3,93	4,02	3,98
3	3,64	3,76	3,63	3,49	3,44	3,74	3,83	3,83
4	3,57	3,74	3,45	3,36	3,42	3,6	3,73	3,63
5	3,58	3,73	3,43	3,39	3,44	3,62	3,71	3,6
7	3,59	3,73	3,52	3,42	3,46	3,66	3,64	3,66
8	3,6	3,78	3,53	3,44	3,46	3,72	3,71	3,67
9	3,61	3,79	3,58	3,47	3,48	3,73	3,73	3,69
10	3,63	3,8	3,6	3,48	3,49	3,73	3,73	3,7
11	3,65	4,1	3,62	3,51	3,5	3,74	3,75	3,7
12	3,68	4,2	3,67	3,55	3,51	3,77	3,75	3,72
14	3,71	4,4	3,7	3,67	3,53	3,78	3,77	3,74
15	3,75	4,44	3,72	3,72	3,59	3,81	3,77	3,85
17	3,82	4,52	3,76	3,63	3,61	4,12	3,79	4,43
18	3,86	5,4	3,8	3,85	3,75	4,28	3,87	4,34

TABELA D 9: Valores de μmol de ácido galactutônico para cálculos da atividade de pectinase em função do tempo da reação enzimática.

Amostras	μmol de ácido galacturônico				
	C1	C2	C3	C4	C5
1	0,22	0,35	0,41	0,41	0,38
2	0,82	0,98	1,12	1,17	1,1
3	0,91	0,98	1,1	1,2	1,12
4	0,57	0,82	0,85	0,82	0,76
5	0,85	0,88	1,1	1,07	0,88

Cn = concentração de ácido galacturônico dos meios de fermentação.