

URI – CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA UTILIZANDO *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM MEIO
SINTÉTICO**

JONAINA GOMES

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

JUNHO DE 2010

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA UTILIZANDO *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM MEIO
SINTÉTICO**

Jonaina Gomes

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D. Sc
Orientadora

Prof. Geciane Toniazzo, D. Sc.
Orientadora

Prof. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert, D. Sc
FURG

Prof. Helen Treichel, D. Sc
URI – Campus de Erechim

21 DE JUNHO DE 2010

Dedicatória

Dedico este trabalho, as pessoas que sempre acreditaram nos meus pequenos sonhos, nas minhas grandes loucuras e ainda andam comigo para um futuro inserto.

AGRADECIMENTOS

Poucas são as oportunidades que temos de fazer agradecimentos a público, e nada mais perfeito do que ao fim de uma jornada de longo estudo, até o mestrado.

Hoje, me sinto uma pessoa melhor, não só na formação profissional, mas como também pessoal.

Conhecer as pessoas, e ver que realmente existem pessoas boas, queridas, amáveis, dedicadas que nos fazem crescer, nos sentirmos importantes, e é a todos vocês que faço este meu agradecimento.

À minha querida família, que em todos os momentos, tanto alegres como os tristes, estavam ao meu lado, acreditando sempre nas minhas decisões. E a você minha mãe, a minha eterna gratidão, obrigada por tudo.

Ao meu amor, companheiro e confidente Giovani, e sua família, por todo amor, carinho, dedicação, me motivando sempre para jamais desistir.

Às professoras Dra. Eunice Valduga e Dra. Geciane Toniazzi, pela valorosa orientação e amizade, contribuindo não somente para minha formação profissional, mas também pessoal.

A todos os Professores que me ajudaram com dedicação em minha formação durante minha vida acadêmica. E inclusive a minha professora de primeira série Prof. Vaine.

Aos companheiros de laboratório, obrigada pelos ensinamentos, paciência, as trocas de experiências e principalmente os momentos de risadas e descontração.

A todos os funcionários da Central de Materiais, que sempre nos apóiam nos momentos que mais precisamos.

As meninas mais “fozinhas” do mundo, Karine e Rosicler, nunca esquecerei vocês, obrigada de todo meu coração pelo apoio e ensinamento.

Após todos estes agradecimentos, se eu tivesse que em um único agradecimento, representar todos os agradecimentos à cima, seria a você JAMILE, pela dedicação, pela força quando mais pensei em desistir. Você se mostrou uma pessoa que eu jamais imaginei. A você minha amiga, colega e companheira obrigada, infinitamente obrigada. Tenho toda a certeza que sem seu trabalho junto a mim, este trabalho não teria o mesmo brilho, você foi fundamental para conclusão do meu trabalho, eternamente serei grata por tudo.

Obrigada, do fundo do meu coração!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

RESUMO

PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM MEIO SINTÉTICO

JONAINA GOMES

JUNHO/2010

Orientadoras: Eunice Valduga e Geciane Toniazzo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de poligalacturonase (PG) pelo micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642 em fermentação submersa com pectina cítrica. As cepas de *Aspergillus niger* ATCC 9642 foram cultivadas em meio PDA durante 5 dias a 30°C. Foi avaliado o efeito da concentração de esporos na produção de PG e da indução por pectina cítrica do micro-organismo *Aspergillus niger*. Após a otimização de meio, foi realizada uma avaliação cinética do crescimento do micro-organismo e da produção de PG. A enzima bruta foi caracterizada em termos de pH e temperatura ótima, estabilidade em altas e baixas temperaturas. Com o objetivo de estudar os efeitos da composição do meio de cultura e condições de fermentação para a produção da enzima, foi realizada uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais. A atividade de PG foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) em espectrofotômetro (540 nm). Com relação a contagem de esporos, observou-se a maior bioprodução de PG na concentração de esporos igual a 5×10^6 esporos/mL e em 24 horas com valor de 18,47 U/mL. O meio não induzido com pectinase não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no estudo de indução definindo-se por utilizar este para a bioprodução de poligalacturonase, no sentido de reduzir custos de produção. A atividade máxima PG (51,82 U/mL) foi obtida no período de 24 horas com a concentração de pectina de 32 g/L, L-asparagina de 2 g/L, fosfato de potássio 0,06 g/L, sulfato de ferro de 1,0 g/L, com agitação de 180 rpm, 30°C e pH inicial de 5,5. Na avaliação cinética, a maior atividade da enzima foi obtida em 27 horas de fermentação (cerca de 44 U/mL). Após este tempo, a atividade se manteve constante, e após 36 horas diminuiu (25 U/mL às 48 horas). A avaliação do pH e temperatura ótimos mostrou que as atividades maiores de PG foram obtidas a 37°C e pH de 5,5. No estudo de estabilidade, observou que a 55°C e pH 5,0, a atividade de PG foi mantida por mais tempo. No estudo da atividade da enzima em baixas temperaturas (4°C, -10°C e -80°C), os resultados mostraram que em todas as temperaturas estudadas, a enzima manteve a atividade inicial até 40 dias de armazenamento, e após este período, uma perda de atividade foi observada.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, ATCC 9642, poligalacturonase, técnica de planejamento experimental, estabilidade.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

ABSTRACT

PRODUCTION OF POLYGALACTURONASE BY SUBMERGED FERMENTATION USING *Aspergillus niger* ATCC 9642 SYNTHETIC MEDIUM

JONAINA GOMES

JUNHO/2010

Advisors: Eunice Valduga e Geciane Toniazzo.

The objective of this work was to evaluate the polygalacturonase (PG) production from *Aspergillus niger* ATCC 9642 by submerged fermentation. The strains of *Aspergillus niger* ATCC 9642 were grown in PDA for 5 days at 30°C. An evaluation of the effect of spore concentration on PG production and induction by citrus pectin micro-organism *Aspergillus niger* was studied. After media optimization, a kinetic study was carried out and the crude enzyme was characterized in terms of optimum pH and temperatures and stability at high and low temperatures. Aiming at evaluating the effects of the composition of the culture medium and fermentation conditions on the enzyme production, a sequential strategy of experimental designs was carried out. Regarding the counting of spores, we observed the highest bioproduction of PG was obtained at a spore concentration of 5×10^6 spores/mL with a value of 18.47 U/mL. The medium not induced with pectinase did not present significant difference ($p < 0.05$) compared to the induced one. The maximum PG activity (51.82 U/mL) was obtained within 24 hours using a pectin concentration of 32 g/L, L-asparagin concentration of 2 g/L, potassium phosphate 0.06 g/L, iron sulphate 1.0 g/L, stirring rate 180 rpm, 30°C and initial pH of 5.5. In the kinetic evaluation, highest enzyme activity was achieved at 27 hours of fermentation (around 44 U/mL). After this time, the activities kept constant and after 36 hours a reduction on enzyme activity (25 U/mL at 48 hours). The evaluation of the optimum pH and temperature showed that highest PG activities were achieved at 37°C and pH 5.5. In the stability study we observed that at 55°C and pH 5.0, the PG activity was kept for longer times. In the study of the enzyme activity at low temperatures (4°C, -10°C and -80°C), results showed that at all studied temperatures, the enzyme kept its initial activity until 40 days of storage and after this time a loss of activity was observed.

Keywords: *Aspergillus niger* ATCC 9642, polygalacturonase, experimental design technique, stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ação da despolimerização da poligalacturonase (GAVA ,1998).....	6
Figura 2 – Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina (ALKORTA, 1998).	6
Figura 3 – Estrutura da parede celular vegetal contendo as moléculas de pectina (MARTIN, 2006).....	8
Figura 4 – Aspectos das colônias do fungo filamentosso <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.	18
Figura 5 – Aspecto visual da massa célula úmida (a) e dessecada (b) do fungo filamentosso <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642, respectivamente.....	19
Figura 6 - Produção de PG em função da concentração de esporos do fungo filamentosso <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	24
Figura 7 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett & Burman, para a produção de poligalacturonase (U/mL).	27
Figura 8 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , para a produção de poligalacturonase (U/mL).....	29
Figura 9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta atividade da poligalacturonase (PG) em função da concentração de fosfato de potássio e sulfato de ferro, respectivamente.....	31
Figura 10 - Estudo cinético da atividade de poligalacturonase e crescimento celular do <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	33
Figura 11 – Superfície de Resposta (a) e Curva de contorno (b) para bioprodução de PG (U/mL) em função da Temperatura (°C) e pH.	36
Figura 12 - Comportamento da atividade do extrato enzimático em função da temperatura (25, 35, 45 e 55°C).	38
Figura 13 - Comportamento da atividade do extrato enzimático quando submetido a temperatura de estocagem (4,-10 e -80°C).....	39
Figura 14 - Atividade poligalacturonásica em função do tempo e do pH do extrato enzimático.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pectinases comercializadas pelas empresas Lyven e Novozymes, com os respectivos nomes comerciais, a origem da enzima e a aplicabilidade do produto.....	11
Tabela 2 - Produção de pectinases em fermentação submersa por diferentes cepas microbianas.	15
Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett & Burman. .	21
Tabela 4 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	21
Tabela 5 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2	22
Tabela 6 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento completo 2^2	23
Tabela 7 - Bioprodução de PG e valores de pH no meio induzido com pectina e meio não induzido.	25
Tabela 8 - Atividade poligalacturonase (U.A) durante 40 minutos de reação.	25
Tabela 9 - Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores codificados e reais) e respostas de atividade de poligalacturonase e pH.	26
Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (valores codificados e reais) e respostas em produção de poligalacturonase e pH.....	28
Tabela 11 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em produção de poligalacturonase e pH.	29
Tabela 12 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de poligalacturonase.....	30
Tabela 13 - Análise de variância para a bioprodução de PG do planejamento fatorial 2^2 completo.	30
Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (com 3 pontos centrais) e resposta das variáveis Temperatura e pH na produção de poligalacturonase.....	34
Tabela 15 – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de poligalacturonase.....	35
Tabela 16 - Análise de variância para a bioprodução de PG do planejamento fatorial 2^2 completo.	35

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
SUMÁRIO.....	x
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Enzimas pectinolíticas	3
2.1.1 Classificação das pectinases.....	3
2.2 Substâncias Pécicas	7
2.3 Aplicação industrial das enzimas pectinolíticas.....	9
2.4 Pectinases disponíveis no mercado	10
2.5 Fermentação submersa.....	11
2.6 Micro-organismos produtores de pectinases.....	14
2.7 Estabilidade enzimática	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Micro-organismo e preparo do inóculo	18
3.2 - Ensaio preliminar da indução durante o crescimento do <i>A.niger</i>	19
3.3-Determinações analíticas	20
3.3.1 - Atividade de poligalacturonase (PG)	20
3.3.2 - pH.....	20
3.4 - Delineamento experimental	21
3.5 – Cinética de Bioprodução.....	22
3.6 - Caracterização da poligalacturonase	22
3.6.1 - Avaliação da temperatura e pH ótimos do extrato bruto	22

3.6.2 - Avaliação da temperatura de estabilidade	23
3.6.3 – Avaliação do pH de estabilidade	23
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 - Produção de Poligalacturonase	24
4.1.1 – Efeito da concentração de esporos.....	24
4.1.2 –Efeito da indução no crescimento do micro-organismo <i>A. niger</i> ATCC 9642	24
4.1.3 - Estudo da medida de atividade poligalacturônica.....	25
4.1.4 – Otimização da bioprodução de poligalacturonase	25
4.2 – Estudo cinético da atividade de Poligalacturonase (<i>PG</i>)	33
4.3 - Caracterização parcial da Poligalacturonase.....	34
4.3.1 - Temperatura e pH ótimos	34
4.3.2 - Estabilidade do extrato enzimático bruto a altas temperaturas	37
4.3.3-Estabilidade do extrato enzimático bruto a baixas temperaturas	39
4.3.4 - Avaliação do extrato enzimático ao pH.....	40
5 – CONCLUSÃO	42
6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	43
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 - INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção industrial, novos recursos tecnológicos e biotecnológicos se fazem necessários para diminuir o tempo de produção, como também por consequência novos recursos terão que ser empregados para tratamentos residuais gerados proporcionalmente ao desenvolvimento industrial, fazendo com que as indústrias no mundo todo busquem alternativas para amenizar e também substituir os processos convencionais para tratamento de resíduos.

Hoje é bastante diversificado e amplo o campo de aplicação industrial das enzimas abrangendo áreas tão diversas como a indústria alimentar, têxtil e de detergentes, por exemplo. A utilização de enzimas em processos industriais tem sido apontada como um fator que reduz largamente a energia necessária para a obtenção de alguns produtos manufaturados.

O uso de enzimas com propósitos tecnológicos pressupõe que elas sejam os catalisadores de processo, capazes de transformar matérias-primas em produtos com maior valor agregado. O uso eficiente das enzimas, separadas do sistema celular do qual se originam, sob condições artificiais de processo, é objeto de intenso estudo nos dias atuais. Dada a inerente habilidade das enzimas, como consequência da sua estrutura proteica, este passo representa um grande desafio tecnológico, o que explica o número ainda relativamente reduzido de processos enzimáticos operando em escala industrial.

Cepas do fungo filamentosso *Aspergillus niger* são as mais utilizadas na produção comercial de pectinases porque suas características toxicológicas são aprovadas em termos legislativos (MALVESSI & SILVEIRA, 2004).

Portanto, para que a aplicação das pectinases se torne viável, é essencial o estudo tanto de parâmetros que viabilizem a sua produção quanto de condições adequadas ao seu uso, tais como: determinação do tempo de fermentação, da temperatura, do tipo de biorreator a ser empregado no processo, da composição adequada do meio de cultivo, etc.

Com base no exposto anteriormente, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de poligalacturonase (PG) por fermentação submersa utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio sintético. Para tal, a metodologia de

planejamento foi utilizada visando estabelecer condições de fermentação que otimizasse a produção de PG.

A partir deste ponto, as seguintes etapas foram também desenvolvidas;

- ✓ Verificar o comportamento cinético da bioprodução de PG;
- ✓ Avaliar a estabilidade da enzima em diferentes condições de Temperatura e pH.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas pectinolíticas

A pectina é o nome descritivo para um grupo diversificado de complexo heteropolímeros presente na lamela média da planta principal parede celular das plantas dicotiledôneas. Isto representa cerca de polímero um terço do total do material da parede celular (ROKAS *et al.*, 2007) e, como tal, representa um importante carbono fonte de bactérias e fungos que degradam o material vegetal.

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos mais diversos processos industriais, em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (BRAVO *et al.*, 2000).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes nas células vegetais (MARTIN *et al.*, 2007). São produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos, por algumas bactérias e por poucas leveduras. O uso de celulases, hemicelulases e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil, papel e celulose (BHAT, 2000). Por volta de 1930 as pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas (KASHYAP *et al.*, 2001). As enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas são largamente conhecido como enzimas pectinolíticas ou pectinases, que incluem poligalacturonase (PG), esterase pectina, pectina liase e pectato liase com base no seu modo de ação (DINU *et al.*, 2007).

2.1.1 Classificação das pectinases

A classificação destas enzimas está baseada nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos, pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo) ou terminal (exo) (UENOJO, 2003). Existem basicamente três tipos de

pectinases: as protopectinases, as despolimerizantes e as pectinesterases.(JAYANI *et al.*, 2005).

Protopectinases: são enzimas que hidrolisam a protopectina insolúvel gerando a pectina polimerizada solúvel. São classificadas em dois tipos: o tipo A que reage com a região de ácido poligalacturônico da protopectina e a do tipo B reage com as cadeias de polissacarídeos que podem se conectar com as cadeias de ácido poligalacturônico e os constituintes das paredes celulares (UENOJO, 2003).

Pectinesterases (PME); Estas enzimas são também conhecidas como polimetilgalacturonato esterase (ALKORTA *et al.*, 1998). Estas enzimas catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico.

A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase (PG). As pectinesterases são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais e podem estar envolvidas em mudanças das substâncias pécticas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (ALKORTA *et al.*, 1998).

A pectinametilesterase remove grupos metoxil da pectina por um ataque nucleofílico da enzima no éster metílico (localizados nos carbonos 6 do grupo carboxílico), resultando na formação de um intermediário substrato-enzima com o lançamento de um metanol. Estes seguem através da desacetilação, o qual sofre uma hidratação do intermediário para regenerar a enzima e liberar um ácido carboxílico (PIMENTA *et al.*, 2000; VORAGEM *et al.*, 2001).

A reação cessa antes que todos os grupos carboxilas sejam removidos. Em parte, essa inibição ocorre pelo aumento da concentração do produto formado (pectato) e, também, devido à possível repulsão entre grupos carboxilas carregados negativamente.

Despolimerases: catalisam a quebra das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) entre os monômeros do ácido D-galacturônico. Essas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise, catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminação (liases). As despolimerases podem ser subdivididas, dependendo da preferência da enzima pelo substrato:

Liases: são também conhecidas como transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (KASHYAP *et al.* 2001).

Pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL): são enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de transeliminação de hidrogênio. Estas enzimas são subdivididas em dois tipos, as endo liases, que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações α (1→4) da pectina e as exo liases, que catalisam a ruptura das ligações α (1→4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora. Atuam preferencialmente no ácido pectínolico (MARTIN, 2006).

Pectato liase (poligalacturonato liases, PGL): São liases que têm preferência por ácido péctico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação). Podendo ser classificadas ainda como endo ou exo (MARTIN, 2006).

Hidrolases: incluem as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases, podem apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) (UENOJO, 2003).

a) Poligalacturonases – PG: são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) da cadeia de ácido poligalacturônico (MARTIN, 2006). São as mais extensivamente estudadas entre as enzimas pectinolíticas (JAYANI, *et al.* 2005). As endopoligalacturonases hidrolisam as ligações glicosídicas α (1→4) internas de forma randômica, causando a despolimerização da molécula e liberando oligômeros de ácido poligalacturônico, enquanto as exopoligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (MARTIN, 2006). As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuir ótimo de atividade na região levemente ácida (ZHENG & SHETTY, 2000).

A reação de despolimerização da pectina acontece quando a poligalacturonase catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α (1→4), que se localizam entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia da pectina, com a introdução de água pela ponte de hidrogênio (RESENDE *et al.*, 2004).

As poligalacturonases podem proporcionar a clivagem dessa cadeia de diferentes formas. As exo-poligalacturonases promovem a redução da unidade externa ou terminal da cadeia poligalacturônica, resultando em um ácido galacturônico como produto da reação principal. Enquanto as endo-poligalacturonases podem catalisar o rompimento aleatório dessa ligação, como ilustra a Figura 1 (ALKORTA *et al.*, 1998).

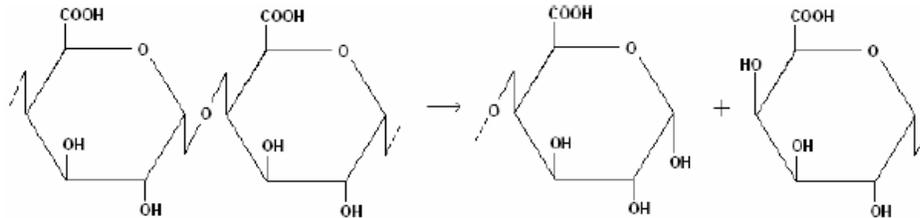


Figura 1 – Ação da despolicimerização da poligalacturonase (GAVA, 1998).

b) Polimetilgalacturonases – PMG: têm preferência pelo substrato altamente metoxilado (ácido pectínico) (MARTIN, 2006).

Na Figura 2, é possível observar como as enzimas pectinolíticas atuam sobre uma molécula de pectina, conforme a classificação anteriormente mencionada.

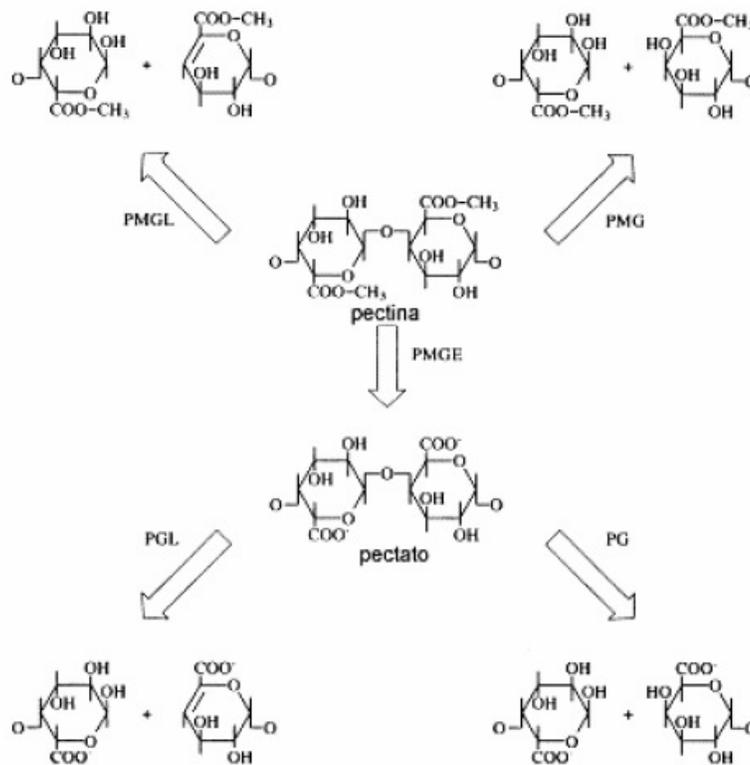


Figura 2 – Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina (ALKORTA, 1998).

Nas situações em que é necessária uma hidrólise completa da pectina, deverá ser utilizada uma preparação de enzima contendo todas as enzimas pécticas, incluindo a pectinesterase. Uma vantagem associada à utilização de preparações sem pectinesterase é a não produção de metanol (PEREIRA, 2005).

A pectólise, ação das enzimas pectinolíticas, é um fenômeno importante, associado a muitos processos biológicos, tais como crescimento de plantas, amadurecimento de frutas e perda de folhas (CASTILHO, 1997).

2.2 Substâncias Pécticas

As substâncias pécticas são definidas como um grupo complexo de polissacarídeos em forma coloidal, contendo uma grande proporção de unidades de ácido anidro galacturônico em forma de cadeia. Os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico podem estar parcialmente esterificados por grupos metílicos e parcial ou totalmente neutralizados pelo sódio, potássio ou íons de amônio. Incluindo as galactanas e arabinanas (KRATCHANOVA *et al.*, 2004).

São importantes componentes da estrutura da parede celular, estando localizadas geralmente entre as microfibrilas de celulose dos tecidos vegetais (Figura 3). Sua maior concentração está localizada na lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular encontrado entre as paredes das células, com redução gradual do espaço entre a parede celular e a membrana plasmática (KRATCHANOVA *et al.*, 2004).

Essas substâncias, depositadas na parede celular primária durante as primeiras etapas de crescimento do vegetal, representam de 0,5 a 4,0% do peso fresco dos vegetais, são geralmente amorfas, têm massa molecular variando de 25 a 360 kDa e grau de polimerização de cerca de 200 a 400. Substituintes podem ser achados nos carbonos das posições C-2 ou C-3 da cadeia principal e podem ser qualquer glicosídeo (D-galactose, D-xilose, L-arabinose e L-ramnose) ou não glicosídeo (acetil). O grau e tipo de ramificação variam e dependem da fonte da substância péctica. A síntese dessas substâncias acontece geralmente no Complexo de Golgi durante as fases iniciais do crescimento da célula (JAYANI *et al.*, 2005).

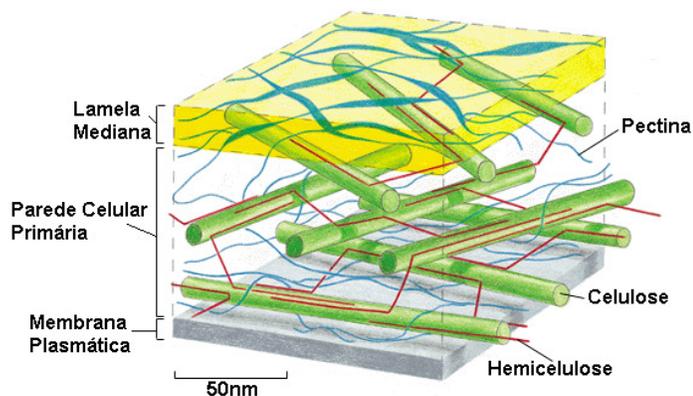


Figura 3 – Estrutura da parede celular vegetal contendo as moléculas de pectina (MARTIN, 2006).

Como a maioria dos polissacarídeos, as substâncias pécnicas são heterogêneas com respeito à estrutura química, peso molecular, grau de esterificação e acetilação, bem como na distribuição e tipo de açúcares neutros ligados. Sua composição varia com a fonte, condições de extração, localização e outros fatores ambientais. Por isso, elas são classificadas em quatro tipos principais: protopectina, pectina, ácidos pécnicos e ácidos pectínicos (THAKUR *et al.*, 1997).

1)Protopectina

Substância pécnica insolúvel em água, presente em tecidos intactos metilados.

2)Pectina

Designa ácidos pectinolíticos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster. Em uma fruta verde, a pectina é ligada a microfibras celulosas na parede de célula. Essa pectina é insolúvel e conseqüentemente conferem rigidez as paredes da célula. Porém, durante o amadurecimento a estrutura da pectina é alterada através de enzimas naturalmente presentes nas frutas. Estas alterações envolvem o desarranjo da cadeia de pectina ou de correntes laterais presas às unidades que compõem a cadeia principal. O resultado é que a molécula de pectina fica mais solúvel.

3)Ácido pectínico

São cadeias de poligalacturonas com até 75% de unidades de galacturonatos.

4)Ácido péctico

Substância solúvel em água, compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster.

2.3 Aplicação industrial das enzimas pectinolíticas

Durante meados da década de 30, quando as indústrias de frutas começaram a produzir suco, o rendimento era baixo e muitas dificuldades foram encontradas para filtrar o suco e se atingir uma clarificação aceitável. A partir de então, pesquisas utilizando pectinases, celulases e hemicelulases de micro-organismos (*Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp.), juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, ajudaram a superar estas dificuldades (BHAT, 2000). Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização nas indústrias de alimentos e bebidas, a seguir estão descritos alguns aspectos dessas e de outras aplicações.

Indústrias de sucos de frutas

A principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração (MARTIN, 2006). As vantagens do uso de pectinases em sucos incluem, por exemplo, utilização em sucos clarificados, não clarificados, concentrados, polpas e purês; redução do tempo total para extração do suco, auxilia na produção de sucos e concentrados estáveis com redução de resíduos da polpa; custos de produção reduzidos e possibilidade de processamento de diferentes frutas (UENOJO & PASTORE, 2007). No caso do suco de laranja, aplicam-se pectinases, porém é importante que permaneça certo teor de pectina insolúvel em suspensão de modo a dar ao suco a sua aparência tipicamente túrbida (CASTILHO, 1997).

Na produção de suco de maracujá as enzimas têm sido adicionadas em uma etapa precedente à filtração, quando há a hidrólise enzimática da estrutura vegetal resultando na degradação dos sólidos em suspensão e diminuição da viscosidade, assim agiliza-se todo o processo (PAULA *et al.*, 2004).

Indústria de vinhos

A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco e reduz o tempo de clarificação. Preparações comerciais de

pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina esterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (BHAT, 2000). Enzimas pectinolíticas adicionadas durante a maceração das uvas para produção de vinho tinto resultam no melhoramento das características visuais, cor e turbidez (JAYANI *et al.*, 2005).

Extração de óleos

Óleos de canola, de coco, semente de girassol e oliva são tradicionalmente produzidos por extração com solventes orgânicos, mais comumente o hexano. A pectinase pode ser usada para extrair óleo vegetal em um processo aquoso, liquefazendo os componentes estruturais da parede celular das sementes que contém o óleo (KASHYAP *et al.*, 2001). No século XXI, preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulases e hemicelulases começaram a serem utilizadas para extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração (UENOJO & PASTORE, 2007)

A preparação de enzima comercial, Olivex (uma preparação de pectinase com baixos níveis de celulase e hemicelulase de *Aspergillus aculeatus*) foi a primeira mistura de enzima usada para melhorar a extração de óleo de oliva. O uso de enzimas na maceração aumenta a quantidade de agentes anti-oxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extra virgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a extração, melhora a centrifugação (BHAT, 2000).

Indústria têxtil

Na indústria têxtil, pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami (BRAVO *et al.*, 2000).

2.4 Pectinases disponíveis no mercado

As empresas Lyven (França), Novozymes (Dinamarca), Novartis (Suíça) e Biocon (Índia) (SILVA *et al.*, 1999), são algumas das mais importantes produtoras mundiais de pectinases (Tabela 1).

2.5 Fermentação submersa

Os processos submersos consistem naqueles em que o micro-organismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação e aeração (micro-organismos aeróbios) (REGULY, 2000) e outros controles, tais como: medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos micro-organismos.

Tabela 1 – Pectinases comercializadas pelas empresas Lyven e Novozymes, com os respectivos nomes comerciais, a origem da enzima e a aplicabilidade do produto.

Nome Comercial	Micro-organismo	Aplicabilidade
PECLYVE CP	<i>Aspergillus niger</i>	Clarificação de sucos de frutas
PECLYVE LI	<i>Aspergillus niger</i>	Liquefação de frutas e vegetais
LYVELIN	<i>Aspergillus niger</i>	Tratamento do linho
PECLYVE V	<i>Aspergillus niger</i>	Fabricação de vinhos
Pectinex Ultra SP-L	Não-reportado	Processamento de frutos
Pectinex SMASH	Não-reportado	Processamento de frutos
Pectinex AFP-L4	Não-reportado	Indústria de sucos
Pectinex AFP MAXXL	Não-reportado	Indústria de sucos

LYVEN (2009); NOVOZYMES (2009).

O processo de produção é delicado e sofre a interferência de grande número de variáveis, que tornam baixas as chances de êxito. A idade da cultura também interfere, as culturas jovens são mais produtivas. A temperatura de armazenamento dos esporos também influi, tendo-se verificado que melhor é a faixa de 0 a 5°C. Interfere, ainda, a composição do meio de esporulação (LIMA *et al.*, 2001).

Os processos fermentativos podem substituir processos puramente químicos, de síntese orgânica, no entanto, aqueles utilizados em escala industrial geralmente dependem da capacidade do micro-organismo responsável em proporcionar bom e

regular rendimento econômico do produto, a partir de um substrato barato e disponível, da facilidade de recuperação ou obtenção do produto visado, sob forma pura ou, conforme o caso, pronta para o uso e da impossibilidade ou dificuldade de se obter o produto através de outros processos (REGULY, 1996).

O processo fermentativo começa com a escolha do agente biológico adequado (micro-organismo ou enzima); segue com a transformação da matéria-prima, em condições que podem exigir esterilização, aeração e controle do processo (pH, temperatura etc.); e finaliza com a separação e purificação do produto final (MALAJOVICH, 2004).

A parte central de um processo fermentativo é o crescimento do micro-organismo industrial em condições ambientais que estimulem a síntese do produto comercial que se pretende obter, portanto, conforme TREVAN *et al.*, (1990), faz-se necessário conhecer os micro-organismos, controlar seu metabolismo e crescimento, bem como, manejá-los em grande escala.

O cultivo de micro-organismo é só uma das numerosas fases do processo. O meio em que cresce o micro-organismo deve ser formulado de acordo com as matérias-primas e, posteriormente esterilizado. O conteúdo do fermentador, depois de esterilizado deve ser inoculado com um cultivo viável, metabolicamente ativo. Logo, para que se possa realizar a fermentação é necessária, em primeiro lugar, obter um micro-organismo adequado para o processo que se pretenda levar adiante, o que se efetua normalmente selecionando cepas naturais. A produtividade do mesmo deve aumentar até se obter níveis econômicos aceitáveis, o que se realiza mediante melhoras por mutação, recombinação ou melhoria do processo (TREVAN *et al.*, 1990).

O processo fermentativo envolve etapas distintas como, a preservação e o crescimento do inóculo, o pré-cultivo no fermentador e a fermentação de produção. A preservação das cepas de produção ao longo de um período de tempo é um requisito básico para uma fermentação. Deve-se encontrar um método ótimo de preservação para cada processo e também para cada cepa. As técnicas utilizadas mais frequentemente são o armazenamento a baixa temperatura (2°C a 6°C); o armazenamento por congelamento (-18°C a -80°C) e a liofilização que é o melhor método de conservação (CRUEGER; & CRUEGER, 1993). Outra técnica amplamente difundida é a preservação em ágar inclinado, que pode ser combinada com a refrigeração.

O crescimento do inóculo tem a finalidade de preparar o micro-organismo em condições apropriadas, de modo a garantir o desenvolvimento adequado das etapas posteriores. O cultivo preservado se prolifera inicialmente mediante crescimento em um cultivo líquido agitado ou em um meio sólido (quando se quer a formação de esporos). As condições utilizadas no cultivo inicial (meio, temperatura, entre outras) dependerão do processo específico. Os tempos normais de crescimento variam em função do tipo de conservação das cepas, sendo que os cultivos refrigerados crescem em um tempo menor. Para se obter bons rendimentos influi, não só o número de células e esporos, mas também o meio nutritivo utilizado para o inóculo, a temperatura de crescimento e a idade do inóculo (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

A concentração ótima de inóculo para um fermentador determina o número de etapas do pré-cultivo que são necessárias. Às vezes, o meio de cultivo de produção se utiliza para a última etapa de formação do inóculo a fim de induzir a formação do produto (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Segundo MALAJOVICH (2004), a composição do meio de cultura depende das necessidades metabólicas do micro-organismo escolhido. Este deve conter todos os nutrientes necessários nas concentrações adequadas, que variam em função do micro-organismo e do objetivo do processo. Os meios de cultura utilizados no laboratório incluem:

- a) água;
- b) uma fonte de energia de carbono: glicose, amido, uréia, soja e outros cereais, etc;
- c) uma fonte de nitrogênio inorgânica (sulfato de amônia, nitrato de potássio, etc.), orgânica (aspargina, succinato de amônia, glutamato, uréia, etc.) ou complexa (farinha de soja, peptona, etc.);
- d) sais minerais, tais como fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, etc.;
- e) elementos traços: ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, molibdênio.

O meio de cultivo tem uma forte influência no processo de fermentação e deve possuir os nutrientes requeridos para o crescimento microbiano, e, além disso, deve favorecer a formação do produto que se deseja (BORZANI *et al.*, 2001).

Os meios nutritivos para a produção devem ser otimizados não só nos ingredientes utilizados, mas também na forma em que se prepara o meio. Os parâmetros mais importantes durante a fermentação são: a temperatura, a aeração, a pressão e a agitação (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

2.6 Micro-organismos produtores de pectinases

Pectinases são enzimas que podem ser obtidas de plantas superiores e micro-organismos, sendo que o gênero *Aspergillus* se destaca como bom produtor destes biocatalisadores, especialmente certas linhagens de *Aspergillus niger* (DARTORA *et al.*, 2002; GUMMADI & PANDA, 2003; HOODAL *et al.*, 2002; TRIBLESS, 2003).

Os fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium*, bactérias do gênero *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Erwinia*, poucas leveduras, como, por exemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococci* e *Rhodotorula*, conseguem evidenciar atividade pectinolítica. Em escala industrial, são obtidas a partir da fermentação de fungos filamentosos como *Aspergillus niger* (PEREIRA, 2005). As espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* são frequentemente usadas por causa da alta atividade pectinolítica exibida por membros do gênero (FAWOLE & ODUNFA, 2003).

A cultura de *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado (PANDEY *et al.*, 1999). Na literatura, vários autores utilizaram o *Aspergillus niger* para produção de enzimas pectinolíticas, dentre eles SANTOS (2007), FONTANA *et al.*, (2005), PANAROTTO *et al.*, (2003), TERZI *et al.*, (2003), CASTILHO (1997).

O fungo filamentoso tem a capacidade de penetrar nos espaços inter e intragranulares por meios mecânicos ou enzimáticos, com a firme fixação das hifas na superfície do substrato e posterior intensa ramificação e penetração na parede celular do substrato pela atuação de enzimas extracelulares produzidas e excretadas pelos micro-organismos (DEL BIANCHI *et al.*, 2001). A maioria dos fungos filamentosos produz esporos. Inóculos de esporos são fáceis de preparar e podem ser armazenados por períodos mais longos do que células vegetativas (MITCHELL *et al.*, 2000).

HENNIES (1996) estudou a produção de pectinases por fermentação submersa e semi-sólida pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584. Verificou que o micro-organismo é capaz de produzir estas enzimas, sendo esta atividade incrementada quando a sacarose está presente no meio de cultivo nos dois tipos de processos fermentativos. A atividade de pectinase apresentou pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 45 °C.

Na Tabela 2 são apresentados alguns trabalhos citados na literatura, enfocando a produção de pectinases, em fermentação submersa empregando diferentes cepas microbianas.

Tabela 2 - Produção de pectinases em fermentação submersa por diferentes cepas microbianas.

Enzima	Substrato	Micro-organismo	Atividade enzimática	Referência
EXO-PG	Pectina cítrica	<i>Aspergillus niger</i>	3,0 U/mL	GALIOTOU & PANAYOTOU <i>et al.</i> , (1997)
EXO-PG	Pectina sintética	<i>Aspergillus niger</i>	33,0 U/g	SOLÍS & PEREIRA <i>et al.</i> , (1993)
ENDO-PG	Pectina e glicerol	<i>Aspergillus japonicus</i>	0,59 U/mL	TEIXEIRA <i>et al.</i> , (2000)
PG	pectina cítrica (NH ₄) ₂ SO ₄ e MgSO ₄	<i>Bacillus</i>	3,5 U/mL 0,8 U/mL	SOARES <i>et al.</i> , (1999)
ENDO-PG	Pectina cítrica	<i>Aspergillus Awamori</i>	0,07 U/mL	BLANDINO <i>et al.</i> , (2002)
EXO-PG	Pectina cítrica	<i>Rhizopus</i>	0,04 U/mL	
EXO-PG	Pectina cítrica	<i>Penicillium viridicatum</i> RFC 3	18 U/mL	SILVA <i>et al.</i> , (2007)
PG	Pectina de maçã	<i>Bacillus sp</i>	42 U/mL	CORDEIRO & MARTINS; (2009)

2.7 Estabilidade enzimática

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações bioquímicas e, como tal, apresentam especialidades para os inúmeros substratos que entram nas reações do metabolismo (SGARBIERI, 1996).

A desnaturação de proteínas é uma alteração sensível na estrutura original da proteína, sem que haja alteração na sequência dos aminoácidos, isto é, sem que haja rompimento ou alterações de ligações químicas primárias, que ligam aminoácidos entre si (SGARBIERI, 1996).

Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas, o calor é que provoca mais modificações nas proteínas, dentro do contexto biológico (GOMES *et al.*, 2007).

As proteínas possuem temperaturas características nas quais apresentam o máximo de estabilidade. A maioria das proteínas são mais estáveis a temperatura de refrigeração, outras são mais estáveis a temperatura ambiente. À medida que a temperatura se eleva acima de 40 – 50°C, praticamente, todas as proteínas tornam-se instáveis, tendendo a uma alteração da conformação original. Quanto ao pH algumas proteínas mantêm suas configurações nativas a valores de pH muito baixos, se a temperatura for mantida baixa. Outras são drasticamente desdobradas, de tal forma que apenas um pequeno decréscimo no pH é suficiente para induzir mudanças de conformação semelhantes àquelas que às proteínas mais estáveis só experimentam pela ação combinada do calor e pH baixo (SGARBIERI, 1996).

Devido às condições de processamento na indústria, como elevadas temperaturas, as enzimas podem se tornar instáveis e se tornarem totalmente inativas durante o processo, assim torna-se importante conhecer certas características das enzimas para avaliar qual melhor faixa de operação para cada uma.

Alguns trabalhos além da produção da poligalacturonase realizaram também estudos de estabilidade enzimática. Por exemplo, ZHENG & SHETTY (2000) verificaram o efeito da temperatura e pH na estabilidade da poligalacturonase produzida por *Lentinus edodes* utilizando resíduos de frutas como substrato. A enzima manteve-se estável em temperaturas acima de 50°C, apresentando 90% da atividade máxima obtida, mas foi completamente desativada quando incubada a 85°C por 20 minutos. Quanto ao

pH, esta PG apresentou alta tolerância a valores de pH baixos (3,5 – 6,5). Os autores ressaltam que, a partir de resíduos das indústrias que processam frutas, é possível obter enzimas com características de resistência a valores de pH ideais para aplicação industrial.

NAIDU & PANDA (2003) estudaram o efeito do pH e da temperatura na desativação de enzimas pectinolíticas produzidas por fermentação submersa num meio composto por glicose, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e o micro-organismo *Aspergillus niger* como agente da fermentação. Neste trabalho foi determinada a taxa de desativação das enzimas polimetilgalacturonases (PMG), poligacturonase (PG) e pectinaliase (PMGL) quando incubadas a diferentes temperaturas e pH, sendo a PMGL considerada a mais estável entre as enzimas estudadas. Para cada uma destas enzimas foi utilizado faixas de pH e temperatura. No caso da PG, o pH selecionado esteve entre 4,5 e 7,5 e as temperaturas estudadas foram de 25, 28, 40, 50 e 60°C. A combinação de pH e temperatura sobre a qual observou-se uma menor taxa de desativação foi 4,8 e 28°C, respectivamente.

MARTINS *et al.*, (2005) também utilizaram fermentação submersa para caracterizar uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus*. Foi investigada a estabilidade térmica e estabilidade frente às variações do pH para esta enzima. Em pH 3,0 – 3,5 a poligacturonase mantiveram, cerca de 91% da atividade original. Em valores de pH elevados houve uma queda na estabilidade. No caso da temperatura, para valores até 50°C, a poligalacturonase conservou 80% da sua atividade original e manteve apenas 6% dessa atividade quando exposta a uma temperatura de 70°C.

A viabilidade de aplicação industrial de catalisadores está diretamente ligada a dois fatores principais: potencial catalítico frente à reação em estudos e estabilidades a variáveis de processos com pH e temperatura (ILLANES, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

A cepa do fungo de *Aspergillus niger* ATCC 9642 (Figura 4) foi cultivada em Potato Dextrose Ágar (PDA) durante 5 dias a 30°C. Em seguida, a coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v), e pérolas de vidro estéreis adicionadas ao frasco, para uma melhor remoção dos esporos. A suspensão resultante foi armazenada a 4°C até sua utilização, o que não ultrapassava um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão, retirada assepticamente, foi diluído de 10 a 10³ vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para uma câmara de Neubauer para contagem dos esporos (FREIRE, 1996).

Para avaliar a influência da concentração de esporos na bioprodução de PG, realizou-se um estudo preliminar utilizando concentrações de 5x10³, 5x10⁴, 5x10⁵, 5x10⁶, 5x10⁷ e 5x10⁸ esporos/mL nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente. O meio de bioprodução de poligalacturonase utilizado constituía-se de 10 g/L de pectina cítrica (VETEC), e 10 g/L extrato de levedura, pH inicial de 5,5 e acrescido de 1mL de esporos na concentração desejada. As condições de cultivos foram a 30°C, 100 rpm e 96 horas de fermentação. Amostras foram coletadas a cada 2 horas e realizada a medida de PG como descrita no item 3.3.1 a seguir.

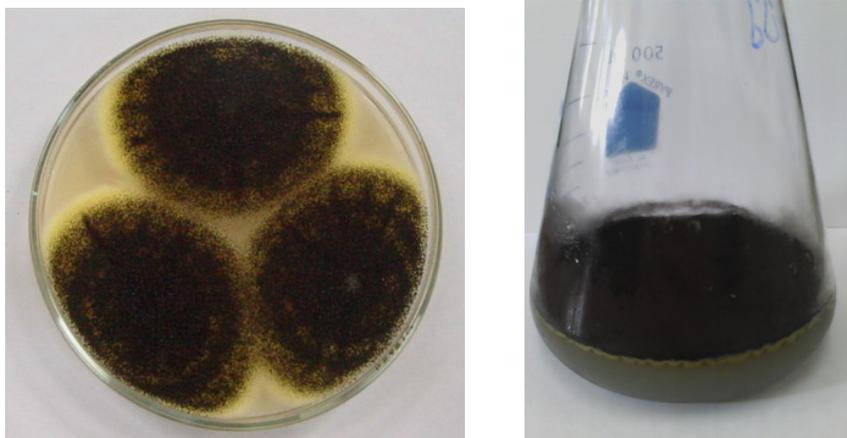


Figura 4 – Aspectos das colônias do fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Para determinar o perfil do crescimento do micro-organismo foi traçada uma curva de crescimento (crescimento celular versus tempo). Alíquotas de 1 mL de

suspensão de esporos de 5×10^6 esporos/mL do micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642 foram transferidas assepticamente para Erlenmeyers 250 mL, contendo 30 mL de meio Potato Dextrose (PD) incubados a 30°C, 180 rpm e quantificando a massa celular durante 120 horas.

Na determinação da concentração celular por medida de peso seco é necessário utilizar amostras de volumes conhecidos que represente o todo. No caso de uma cultura micelial, ou crescimento com formação de *pellets*, a distribuição da biomassa impede que sejam retiradas amostras de partes do volume. Sendo assim, para se determinar a curva de crescimento do fungo filamentoso utilizado neste estudo, após o crescimento deste em um meio apropriado, em cada ponto de amostragem, um frasco inteiro foi filtrado a vácuo (MARCONI Modelo MA 058) e a biomassa retida no papel de filtro previamente tarado, foi dessecada em estufa (ODONTO BRÁS MOD-EL-1.3) a 105°C por aproximadamente 24 horas. A curva de crescimento microbiano foi construída a partir dos dados de biomassa obtidos a partir do peso seco.



Figura 5 – Aspecto visual da massa célula úmida (a) e dessecada (b) do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642, respectivamente.

3.2 - Ensaio preliminar da indução durante o crescimento do *A.niger*

O meio utilizado para determinação da influência de indução ou não do micro-organismo durante o seu crescimento foi PDA. Para o meio sem indução foi utilizado uma concentração de PDA igual a 39 g/L, e para o meio induzido foi utilizado pectina cítrica (VETEC) na concentração de 10 g/L e 39 g/L de PDA. A concentração de esporos do microrganismo foi fixada em 5×10^6 esporos/mL.

O meio de bioprodução de poligalacturonase utilizado constituía-se de 10g/L de pectina cítrica (VETEC), e 10g/L extrato de levedura e pH inicial de 5,5. As condições de cultivos foram a 30°C, 100 rpm e 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3-Determinações analíticas

3.3.1 - Atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade pectinolítica de poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalisílico (DNS), proposto inicialmente por MILLER (1959), com algumas modificações.

Inicialmente, preparou-se 1000 µL de substrato (solução 0,5 % de pectina cítrica (Sigma) em tampão acetato de sódio pH 5,5) e incubou-se a 40°C por 15 minutos para estabilização de temperatura. A seguir, 500 µL de extrato enzimático foram adicionados ao substrato e a reação incubada a 40 °C em diferentes períodos de reação (1,2,3,4,5, 6, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 30 e 40 minutos), para definir o tempo ótimo de reação para medida de atividade. Após a adição de 1 mL de solução de DNS, a mistura foi mantida em ebulição por 8 minutos para formação de cor, resfriada em banho de gelo e adicionados 8,0 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para estabilização de cor.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro Beckman Coulter, modelo DU640, a 540 nm, contra o branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) segundo uma curva padrão estabelecida com ácido α -D-galacturônico (Fluka Chemica, massa molecular 212,16) como açúcar redutor. A atividade da poligalacturonase foi expressa em unidade de atividade por mL (U/mL). As análises foram realizadas em triplicatas de fermentação e reação, bem como de leitura.

3.3.2 - pH

O pH dos meios de cultivo foi determinado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed).

3.4 - Delineamento experimental

Os efeitos da composição do meio de cultura foram avaliados através de um planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais. As variáveis e níveis investigados encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett & Burman.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Pectina (g/L)	X ₁	2,0	11,0	22,0
L- Asparagina (g/L)	X ₂	0	2,0	4,0
Extrato de levedura (g/L)	X ₃	0	10,0	20,0
Sulfato de magnésio (g/L)	X ₄	0	0,5	1,0
Fosfato de potássio (g/L)	X ₅	0	2,0	4,0
Sulfato de ferro (g/L)	X ₆	0	0,01	0,02

*Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH 5,5; 24 horas.

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett & Burman realizou-se um planejamento fatorial 2^{4-1} , com três repetições no central, totalizando 11 ensaios. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Pectina (g/L)	X ₁	22,0	32,0	42,0
L- Asparagina (g/L)	X ₂	2,0	4,0	6,0
Fosfato de potássio (g/L)	X ₅	2,0	4,0	6,0
Sulfato de ferro (g/L)	X ₆	0,02	0,04	0,06

*Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH 5,5 em 24 horas.

As variáveis independentes estudadas no terceiro planejamento fatorial 2^2 (Tabela 5), foram a concentração de sulfato de ferro e fosfato de potássio, fixando-se a pectina (32g/L), L-asparagina (2 g/L), agitação (180 rpm), temperatura (30°C), pH_{inicial} (5,5) e tempo de bioprodução (24 horas). A faixa de estudo do planejamento fatorial completo foi determinado a partir dos resultados do planejamento fatorial fracionário independente e seus respectivos níveis observados na Tabela 5.

As variáveis dependentes analisadas foram à atividade da poligalacturonase e pH. Os planejamentos experimentais (Placktt & Burman, fracionário e completo) foram analisados através do Software Statistica 6.0, a um nível de confiança de 95%.

Tabela 5 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2².

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
Sulfato de ferro (g/L)	X ₆	0	0,02	0,06	0,1	0,12
Fosfato de potássio (g/L)	X ₅	0,3	0,5	1	1,5	1,7

Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH 5,5 em 24 horas, pectina 32 g/L e L-asparagina 2 g/L.

3.5 – Cinética de Bioprodução

O estudo cinético de bioprodução foi realizado a partir das condições experimentais otimizadas (0,06 g/L de Sulfato de ferro, 1 g/L de sulfato de potássio, 32 g/L de pectina e 2 g/L de L-asparagina, 180rpm, 30°C, pH 5,5 e 48 horas), tendo como objetivo avaliar a atividade poligalacturonase em função de diferentes tempos de bioprodução. Sendo a coleta de amostras realizada a cada 3 horas até a última medida ser feita nas 48 horas de bioprodução.

3.6 - Caracterização da poligalacturonase

A caracterização da enzima (extrato bruto) é de suma importância para o estabelecimento das condições de aplicação, como temperatura e pH ótimos e a estabilidade da atividade enzimática durante seu armazenamento em diferentes temperaturas, uma vez que tais condições podem ter uma grande variação de acordo com a origem e os meios de produção utilizados.

3.6.1 - Avaliação da temperatura e pH ótimos do extrato bruto

A atividade enzimática da PG foi realizada através de dosagem de açúcares redutores pelo método DNS como descrita no item 3.3.1., onde descreve as condições de produção. O extrato enzimático bruto foi submetido a diferentes valores de pH (3,0; 3,4; 4,5 e 5,5) e o período da bioprodução foi de 48 horas. Os tampões biftalato de potássio mais HCl (0,1M) para ajustar o extrato enzimático ao pH 3,0 e 3,4 e o fosfato de sódio (0,1M) para os pHs 4,5 e 5,5, respectivamente, foram utilizados para ajustar os valores de pH. Além disso, as amostras foram incubadas em banho termostático (TECNAL TE-210) nas temperaturas de 30, 37, 55, 73 e 80°C, respectivamente.

Para a determinação da temperatura e pHs ótimos foi utilizado um planejamento completo 2², sendo que as variáveis e os níveis utilizados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento completo 2².

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
pH	X ₇	3	3,4	4,5	5,5	6
Temperatura	X ₈	30	37	55	73	80

Variáveis fixas: pectina 32 g/L e L-asparagina 2 g/L. Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH 5,5 em 24 horas.

3.6.2 - Avaliação da temperatura de estabilidade

A fim de determinar a temperatura de estabilidade do extrato enzimático bruto este foi submetido a altas (25, 35, 45 e 55°C) e baixas (4, -10 e -80°C) temperaturas.

O extrato enzimático bruto foi obtido após 48 horas de fermentação, onde este foi filtrado e armazenado em frascos para posterior avaliação da estabilidade. A dosagem da atividade foi realizada utilizando tampão acetato de sódio em pH 5,5 e temperatura de 37°C.

3.6.3 – Avaliação do pH de estabilidade

Para determinação do pH de estabilidade, foi ajustado o pH do extrato enzimático com diferentes tampões: biftalato de potássio mais HCl (0,1 M) para ajustar o extrato enzimático ao pH 5,0, fosfato de sódio (0,1 M) para os pHs 7,0 e 9,0, e solução de Kolthoff (0,1 M) para o pH 11,0 respectivamente, para se chegar ao pH desejado de 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0. As dosagens de atividade foram realizadas utilizando tampão acetato de sódio em pH 5,5 e temperatura de 37°C.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Produção de Poligalacturonase

4.1.1 – Efeito da concentração de esporos

Com relação a contagem de esporos, observou-se a maior bioprodução de PG na concentração de esporos igual a 5×10^6 esporos/mL, em 24 horas com valor de 18,47 U/mL, nos demais tempos de bioprodução foram encontradas atividades menores. A partir desta análise fixou-se a concentração de esporos par 5×10^6 esporos/mL e o tempo de bioprodução em 24 horas.

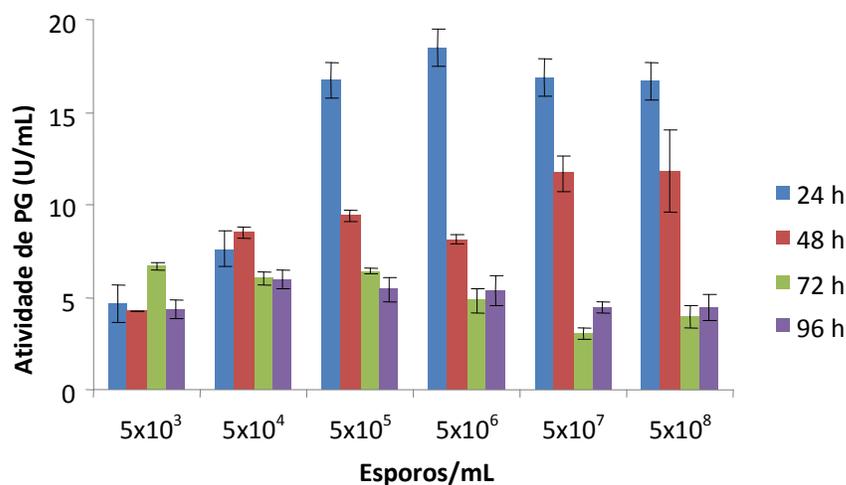


Figura 6 - Produção de PG em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642.

4.1.2 –Efeito da indução no crescimento do micro-organismo *A. niger* ATCC 9642

O estudo de indução foi realizado com a finalidade de verificar se o micro-organismo apresenta maior bioprodução de PG quando induzido ou não com pectina no seu crescimento. A Tabela 7 apresenta os valores de PG e pH para o micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio induzido e não induzido com pectina.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios. Partindo-se destes resultados definiu-se por utilizar o meio não induzido com pectina para a bioprodução de poligalacturonase, no sentido de reduzir custos de produção.

Tabela 7 - Bioprodução de PG e valores de pH no meio induzido com pectina e meio não induzido.

<i>Ensaio</i>	<i>*PG (U/mL)</i>	<i>*pH</i>
Meio induzido	13,11 ± 0,325 ^a	5,32 ± 0,178 ^a
Meio não induzido	12,20 ± 0,418 ^a	5,17 ± 0,053 ^a

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais/colunas não diferem estatisticamente a nível 5% (Teste Tukey).

4.1.3 - Estudo da medida de atividade poligalacturônica

A Tabela 8 apresenta a variação dos valores de unidade de absorvância (U.A) durante 40 minutos de reação da medida da atividade poligalacturônica. As unidades de absorvância, nos tempos de 6, 10, 12,5 e 20 minutos, não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). Em função deste resultado, a medida da atividade de poligalacturonase foi fixada em 6 minutos de reação.

Tabela 8 - Atividade poligalacturonase (U.A) durante 40 minutos de reação.

<i>Tempos (min)</i>	<i>Absorvância (U.A)</i>
1	0,856 ± 0,01 ^c
2	0,839 ± 0,02 ^c
3	0,852 ± 0,01 ^c
5	0,847 ± 0,02 ^c
6	0,984 ± 0,04 ^b
7,5	1,047 ± 0,12 ^b
10	0,962 ± 0,03 ^b
12,5	0,910 ± 0,01 ^b
15	1,061 ± 0,03 ^a
20	1,030 ± 0,06 ^a
30	1,013 ± 0,08 ^a
40	1,052 ± 0,07 ^a

*Média ± erro padrão seguida de letras iguais/colunas não diferem estatisticamente à nível de 5% (Teste Tukey).

Raras são as informações que relacionam estudo cinético de medida de atividade pectinolítica, SOARES *et al.*, (1999) realizaram estudo de medida de atividade de PG em incubação a 40 °C e 10 minutos de reação, utilizando *Bacillus* sp em fermentação submersa. MALLER (2008) realizou a medida de atividade de PG incubando por 10 minutos a 40 °C, utilizando fungo filamentosos *Aspergillus niveus*.

4.1.4 – Otimização da bioprodução de poligalacturonase

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento tipo Plackett & Burman com os valores (codificados e reais) das variáveis independentes estudadas Pectina, L-

Asparagina, Extrato de levedura, Sulfato de magnésio, Fosfato de potássio e Sulfato de Ferro e as respostas em atividade da poligalacturonase (PG) e pH.

Tabela 9 - Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores codificados e reais) e respostas de atividade de poligalacturonase e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes*						Resposta	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	PG (U/mL)	pH
1	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	13,91	5,42
2	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	23,88	3,61
3	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	-1 (0)	1,28	5,89
4	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	18,10	4,60
5	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	37,35	4,31
6	1 (22)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	32,92	5,31
7	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	2,07	7,09
8	-1 (2)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	0,11	5,51
9	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	1 (0,02)	0,01	5,64
10	1 (22)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	20,49	5,91
11	-1 (2)	1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,02)	3,75	6,24
12	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	8,71	6,42
13	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	13,09	6,57
14	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	10,25	6,87
15	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	10,60	7,19

*X₁= Pectina (g/L), X₂= L-Asparagina (g/L), X₃= Extrato de levedura (g/L), X₄= Sulfato de magnésio (g/L), X₅= Fosfato de potássio (g/L), X₆= Sulfato de Ferro (g/L). Variáveis independentes fixas: 180rpm, 30°C, 24 horas e pH_{inicial} = 5,5.

A máxima concentração de poligalacturonase foi obtida no ensaio 5 de 37,35U/mL, onde o meio de cultivo apresentava a maior concentração de pectina (22g/L), a L-Asparagina (4g/L), sulfato de magnésio (1g/L), fosfato de potássio (4g/L), e a menor concentração de extrato de levedura (20g/L) e sulfato de ferro (0g/L).

A Figura 7 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas. Verifica-se que as variáveis pectina, fosfato de potássio e L-asparagina, tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 90%, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumentarem do nível -1 para o +1 haverá aumento na atividade enzimática. Entretanto, o extrato de levedura apresentou efeito negativo significativo ($p < 0,10$), como essa variável independente no nível -1, a concentração foi nula, esta foi excluída do processo fermentativo. De acordo com os resultados obtidos com o planejamento experimental Plackett & Burman as faixas das

variáveis foram ampliadas, sendo que a Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} e as respostas em atividade enzimática (PG) e pH.

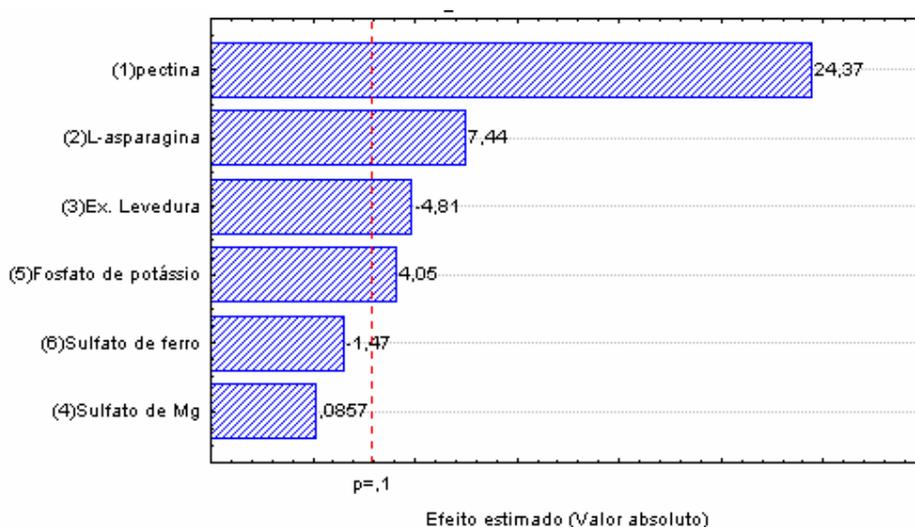


Figura 7 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett & Burman, para a produção de poligalacturonase (U/mL).

Em todos os ensaios foi realizado o monitoramento do pH (Tabela 9), onde se observou que o comportamento do pH é aleatório, a produção de PG, verifica-se que de maneira geral, onde houve um aumento da atividade (Ensaio 2, 4, 5 e 6) ocorreu um decréscimo do pH quando comparado ao inicial (5,5).

FAWOLE & ODUNFA (2003) avaliaram os efeitos das condições do meio de cultura e operacionais na produção de enzimas pectinolíticas em uma cepa de *Aspergillus niger*, isoladas de laranjas em deterioração. Poligalacturonase e pectinametilsterase foram encontrados por ser induzida por ácido poligalacturônico e pectina em meio, respectivamente. Sulfato de amônio foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ambas as enzimas. Houve variações nos níveis de enzima produzida com a idade da cultura, sendo os mais altos níveis em culturas de quatro dias. A temperatura e o pH também tiveram efeitos sobre a produção de enzimas pécnicas sendo as melhores condições de 40°C e pH 5,5, respectivamente.

De acordo com a Tabela 10, verifica-se que a máxima concentração de poligalacturonase foi de 36,09 U/mL (ensaio 1), onde o meio de cultivo apresentava as

menores concentrações de pectina (22g/L), L-Asparagina (2g/L), fosfato de potássio (2g/L), sulfato de ferro (0,06g/L).

Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (valores codificados e reais) e respostas em produção de poligalacturonase e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes*				Resposta	
	X ₁	X ₂	X ₅	X ₆	PG (U/mL)	pH
1	-1 (22)	-1 (2)	-1 (2)	-1 (0,02)	36,09	4,24
2	-1 (22)	-1 (2)	1 (6)	1 (0,06)	23,06	4,16
3	1 (42)	-1 (2)	1 (6)	-1 (0,02)	19,97	4,06
4	1 (42)	-1 (2)	-1 (2)	1 (0,06)	35,31	4,39
5	-1 (22)	1 (6)	1 (6)	-1 (0,02)	21,03	4,41
6	-1 (22)	1 (6)	-1 (2)	1 (0,06)	28,64	4,29
7	1 (42)	1 (6)	-1 (2)	-1 (0,02)	23,31	4,32
8	1 (42)	1 (6)	1 (6)	1 (0,06)	23,69	4,36
9	0 (32)	0 (4)	0 (4)	0 (0,04)	33,50	4,27
10	0 (32)	0 (4)	0 (4)	0 (0,04)	34,73	4,26
11	0 (32)	0 (4)	0 (4)	0 (0,04)	35,14	4,30

*X₁= Pectina (g/L), X₂= L-Asparagina (g/L), X₅= Fosfato de potássio (g/L), X₆= Sulfato de Ferro (g/L). Variáveis independentes fixas: 180rpm, 30°C, 24 horas e pH_{inicial}=5,5.

Os valores dos ensaios 9, 10 e 11 (pontos centrais) foram próximos ao do ensaio 1. Nos ensaios foi realizado o monitoramento do pH, onde observou-se uma leve acidificação do meio em todos os ensaios.

Conforme observado na Figura 8, a qual apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para poligalacturonase. Verifica-se que o sulfato de ferro foi à única variável que exerceu efeito positivo significativo ($p < 0,05$), o que significa que quando a concentração e/ou faixa desta variável for aumentada, possivelmente haverá um acréscimo na atividade enzimática.

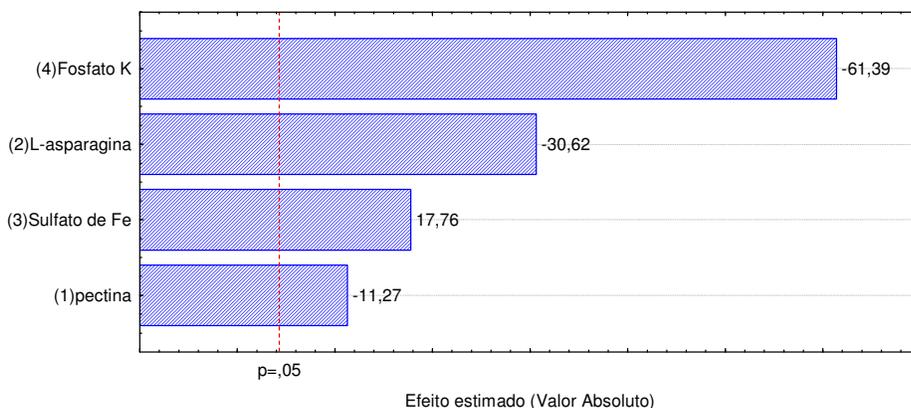


Figura 8 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , para a produção de poligalacturonase (U/mL).

Nesse sentido um terceiro planejamento do tipo fatorial completo 2^2 (14 ensaios e 3 pontos centrais), foi realizado, sendo que a Tabela 11 apresenta matriz do planejamento com as respostas em produção de poligalacturonase e pH.

A máxima atividade de PG foi de 51,82 U/mL (Tabela 11) obtida nos ensaios 9, 10 e 11, correspondendo ao ponto central de concentração dos dois substratos (0,06g/L de sulfato de ferro e 1g/L de fosfato de potássio) que compõe o meio de fermentação, caracterizando a otimização da produção de poligalacturonase.

Tabela 11 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em produção de poligalacturonase e pH.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Respostas	
	X ₆	X ₅	PG (U/mL)	pH
1	-1 (0,02)	-1 (0,5)	36,37	4,14
2	1 (0,1)	-1 (0,5)	47,79	4,31
3	-1 (0,02)	1 (1,5)	32,09	4,21
4	1 (0,1)	1 (1,5)	21,23	4,22
5	-1,41 (0)	0 (1)	31,59	4,06
6	1,41 (0,12)	0 (1)	48,26	4,23
7	0 (0,06)	-1,41 (0,3)	38,70	4,08
8	0 (0,06)	1,41 (1,7)	18,01	4,28
9	0 (0,06)	0 (1)	46,77	4,18
10	0 (0,06)	0 (1)	51,27	4,01
11	0 (0,06)	0 (1)	51,82	4,20

*X₆= Sulfato de ferro (g/L), X₅= Fosfato de potássio (g/L), variáveis fixas: pectina 32 g/L e L-asparagina 2 g/L. Variáveis independentes fixas: 180rpm, 30°C, pH inicial 5,5 e 24 horas.

A Tabela 12 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da poligalacturonase. A concentração de fosfato de potássio mostrou uma influência significativa negativa ($p < 0,05$) sobre a produção de atividade da poligalacturonase. Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA).

Tabela 12 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de poligalacturonase.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
<i>Média</i>	49,95	1,60	31,23	0,001
(1)Sulfato de ferro(L)	3,02	0,98	3,07	0,091
Sulfato de ferro(Q)*	-4,96	1,17	-4,24	0,051
(2)Fosfato de potássio(L)*	-7,53	0,98	-7,67	0,016
Fosfato de potássio(Q)*	-10,78	1,17	-9,21	0,011
1L.2L*	-5,57	1,39	-4,02	0,057

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Os resultados do planejamento fatorial completo 2^2 foram tratados estatisticamente obtendo-se um modelo empírico codificado (Equação 1) para a atividade enzimática em função das variáveis estudadas, o qual foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 13. Verifica-se que o coeficiente de correlação de 0,84 e o valor de F calculado foi 2,12 vezes maior que o valor tabelado permitindo a validação do modelo. Com o modelo codificado foi possível a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na apresentada na Figura 9.

Tabela 13 - Análise de variância para a bioprodução de PG do planejamento fatorial 2^2 completo.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	2	985,17	492,59	9,46
Resíduo	8	416,69	52,09	
Falta de Ajuste	6	401,34		
Erro Puro	2	15,35		
Total	10	1401,86		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação $R = 0,84$, $F_{\text{tab},95\%} = 4,46$

Equação 1:

$$PG = 49,95 - 7,52 \cdot X_5 - 4,96 \cdot (X_6)^2 - 10,7 \cdot (X_5)^2 - 5,57 \cdot (X_5) \cdot (X_6) \quad (1)$$

Onde: PG = Atividade de poligalacturonase (U/mL); X_5 = Fosfato de potássio; X_6 = Sulfato de ferro

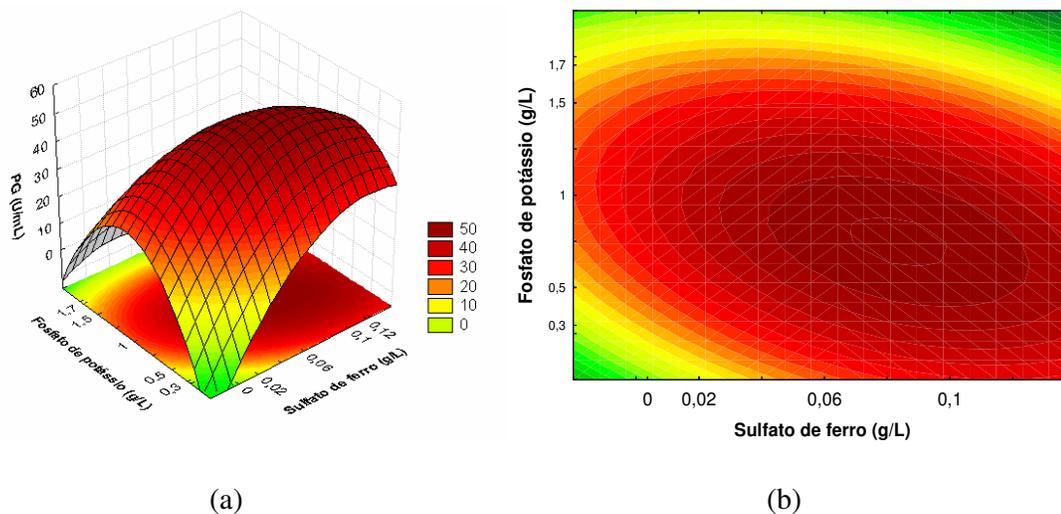


Figura 9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta atividade da poligalacturonase (PG) em função da concentração de fosfato de potássio e sulfato de ferro, respectivamente.

A Figura 9, mostra a máxima produção de PG (51,82 U/mL), encontrada na região próxima de 0,06 g/L de sulfato de ferro e 1 g/L de sulfato de potássio, os quais caracterizam a otimização da bioprodução, dentro da faixa estudada.

Existem poucos trabalhos na literatura que relatam os efeitos dos meios de cultura na otimização da atividade poligalacturonase. TARI *et al.*, (2007) avaliaram a biomassa, o tamanho do pellet e poligalacturonase (PG) por *Aspergillus sojae* ATCC 20235 utilizando a metodologia de superfície resposta. De acordo com os resultados da metodologia de superfície de resposta, as concentrações iniciais de malto dextrina e água de maceração de milho (AMM) e velocidade de agitação, foram significativos ($p < 0,05$) sobre a produção da enzima PG e formação de biomassa. Como resultado dessa otimização, a atividade PG máxima 13,5 U/mL foi possível em maiores concentrações de malto dextrina (120 g/L), e em menores concentrações AMM (0 g/L), alta velocidade de agitação (350 rpm) e alta concentração de esporos 2×10^7 esporos totais.

FONTANA *et al.*, (2005), avaliaram a produção de endo e exo-poligalacturonase (PG) por *Aspergillus oryzae* IPT 301 em um biorreator de tanque agitado (STR) e de um biorreator airlift de circulação interna. Utilizando um planejamento fatorial

experimental, a partir das 96 horas, os valores máximos de atividade enzimática obtidos para exo e endo-PG, foram 65,2 U/mL e 91,3 U/mL, no STR, com valores similares de atividade de 60,6 U/mL e 86,2 U/mL, respectivamente, sendo realizados no biorreator airlift.

TERZI *et al.*, (2003) estudaram a produção de PG por *Aspergillus niger* 3T5B8 e farelo de trigo como substrato. Observaram a influência da concentração de inóculo e umidade do meio de fermentação sobre a produção da enzima e observaram que a combinação entre a menor umidade inicial e a maior concentração de inóculo foram apropriadas a produção da enzima, atingindo 33 U/mL em 64 horas de processo fermentativo.

BOTELLA *et al.* (2007) observaram o efeito da umidade inicial (60% w/w) e a suplementação com uma fonte de carbono na produção de pectinase e xilanase por *Aspergillus awamori*, com polpa de uva como substrato. Quando estudaram o meio contendo 6% de glicose (40 U/mL), a produção de ambas as enzimas aumentou significativamente, mas com glicose na concentração de 8% a atividade enzimática diminuiu, vale ressaltar que o estudo da concentração de glicose foi de 2 a 8%. A máxima produção foi de aproximadamente 40 U/mL em 48 horas de cultivo.

Em todos os ensaios de cada planejamento completo 2² foi realizado o monitoramento do pH, onde se observou que o comportamento do pH é aleatório a produção de PG, sendo verificado que há um declínio de pH (5,5 para 4,01) em todos os ensaios (Tabela 14) independente da concentração das variáveis independentes estudadas (Fosfato de potássio e Sulfato de ferro). Observado que as variáveis independentes não exercem efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o pH.

Segundo UENOJO & PASTORE (2007) e CORDEIRO & MARTINS (2009), a razão dessa alteração do pH pode ser explicada pela liberação de ácido galacturônico no meio, pela ação de enzimas pectinolíticas produzidas pelos micro-organismos durante as primeiras horas de bioprodução. MING CHU (1992), afirma que a acidificação ou alcalinização do meio de cultura reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e, quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino. Devido a esta relação entre a síntese de poligalacturonase e a utilização de compostos

nitrogenados, a variação do pH pode ser utilizada para fornecer informações importantes sobre a produção de poligalacturonase, como no início e fim de sua síntese.

4.2 – Estudo cinético da atividade de Poligalacturonase (PG)

A partir do estudo cinético da atividade de PG, observa-se através Figura 10, que a atividade máxima (44 U/mL) foi obtida em 27 horas de incubação da cultura. Subsequentemente, os níveis de atividade da enzima permaneceram elevados até 36 horas e, então, caíram para aproximadamente 25 U/mL em 48 horas. Cabe salientar que a maior produção de PG ocorreu entre 27 e 30 horas estando relacionada a fase exponencial de crescimento do micro-organismo.

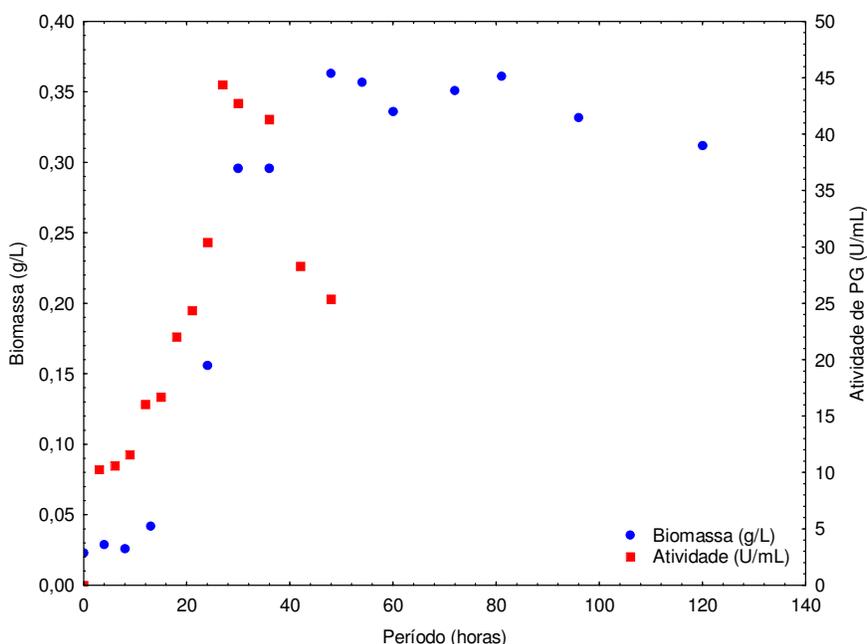


Figura 10 - Estudo cinético da atividade de poligalacturonase e crescimento celular do *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Estudos realizados demonstraram diferentes atividades, comparadas as estudadas neste trabalho. KASHYAP *et al.*, (2000) obtiveram máxima atividade de pectinase (53 U/ml) em 24 horas de incubação. TERZI *et al.*, (2003) estudaram a produção de PG por *Aspergillus niger* 3T5B8 e obtiveram 33 U/mL em 64 horas de bioprodução. BOTELLA *et al.*, (2007) observaram que a máxima produção de pectinase por *Aspergillus awamori*, foi de 40 U/mL em 48 horas de bioprodução.

4.3 - Caracterização parcial da Poligalacturonase

Os métodos de caracterização enzimática tornam-se muito importantes para verificar sua aplicabilidade industrial. Estes processos utilizam ensaios enzimáticos como ferramenta, dentre os quais se encontram a averiguação da temperatura e pH ótimo, estabilidade térmica e estabilidade ao pH.

Após a extração da enzima produzida por fermentação submersa na condição otimizada, procedeu-se a sua caracterização parcial da enzima poligalacturonase.

4.3.1 - Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto produzido por *Aspergillus Niger* em condições otimizadas de fermentação, foi feita através da realização de um planejamento fatorial 2^2 completo com 3 pontos centrais, e a matriz do planejamento experimental bem como os resultados de atividade poligalacturonásica obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (com 3 pontos centrais) e resposta das variáveis Temperatura e pH na produção de poligalacturonase.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Respostas
	pH	Temperatura	U/mL
1	-1(3,4)	-1(37)	17,08
2	1(5,5)	-1(37)	72,93
3	-1(3,4)	1(73)	29,54
4	1(5,5)	1(73)	34,90
5	-1,41(3)	0(55)	15,69
6	1,41(6)	0(55)	69,62
7	0 (4,5)	-1,41(30)	41,61
8	0 (4,5)	1,41(80)	35,99
9	0 (4,5)	0(55)	32,50
10	0 (4,5)	0(55)	29,06
11	0 (4,5)	0(55)	30,75

Variáveis independente fixas: pectina 32 g/L e L-asparagina 2 g/L. Variáveis independentes fixas: 180rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5 e 24 horas.

A Tabela 15 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão e limites de confiança para a bioprodução de PG a um nível de confiança de 95%. Verifica-se que a Temperatura e o pH apresentaram efeito significativo.

Tabela 15 – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de poligalacturonase.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
<i>Média</i>	30,78	0,99	30,98	0,001
(1)pH (L)*	17,21	0,61	28,24	0,001
pH (Q)*	5,43	0,73	7,46	0,017
(2)Temperatura(L)*	-4,20	0,61	-6,89	0,020
Temperatura(Q)*	3,49	0,73	4,80	0,041
1L by 2L*	-12,62	2,04	-6,20	0,002

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A equação 2 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PG em função das variáveis analisadas (pH e Temperatura), dentro da faixa estudada. Através da análise de variância (Tabela 17) obteve-se o F calculado de 2,5 vezes maior que o valor tabelado e coeficiente de correlação de 0,97, os quais permitiram a validação do modelo codificado (equação 2) e a construção das superfícies de resposta apresentadas na figura 11.

Tabela 16 - Análise de variância para a bioprodução de PG do planejamento fatorial 2² completo.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	5	1048,24	209,65	12,63
Resíduo	5	83,01	16,60	
Falta de Ajuste	3	77,09		
Erro Puro	2	5,92		
Total	10	3409,64		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; F_{tab,95%}=5,05

Equação 2:

$$PG \text{ (U/mL)} = 30,78 + 17,21.X_7 + 5,43X_7^2 - 4,20X_8 + 3,49X_8^2 - 12,62 X_7. X_8 \quad (2)$$

Onde:

PG = Atividade de PG (U/mL)

X₇= pH

X₈= Temperatura

Com o modelo empírico validado, construíram-se as superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 11.

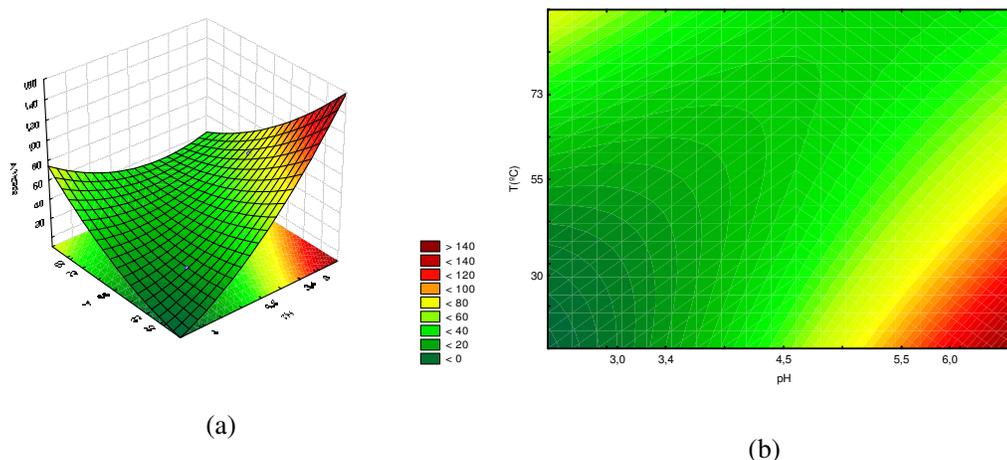


Figura 11 – Superfície de Resposta (a) e Curva de contorno (b) para bioprodução de PG (U/mL) em função da Temperatura (°C) e pH.

A partir dos resultados apresentados no planejamento fatorial 2^2 completo para as variáveis de pH e temperatura (Tabela 14), onde no ensaio 2 foi observado a maior atividade com valor de 72,93 U/mL, definiu-se a temperatura de reação sendo 37°C e o pH de 5,5.

A partir da determinação dos valores de temperatura (°C) e pH ótimos do extrato enzimático bruto, a reação foi realizada em pH 5,5 e temperatura de 37°C. Observa-se que ocorre um aumento da atividade (Figura 11) à medida que o pH aumenta e a temperatura diminui, respeitando as faixas estudadas.

Na literatura consultada, observou-se que as temperaturas utilizadas por diferentes autores foram superiores a otimizada neste trabalho, e o pH apresentando grande variações. QUIROGA *et al.*, (2009) em estudos com a enzima exopoligalacturonase produzido pelo *Pycnoporus sanguineus* obteve pH ótimo de 4,8 e temperatura ótima observada entre 50 a 60°C.

KASHYAP *et al.*, (2000) descreve poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* com atividade máxima em torno de 50°C. Assim como MOYO *et al.* (2003) que descreve poligalacturonases produzidas *Kluyveromyces wickerhamii* com a mesma temperatura ótima. No entanto, MOHAMED *et al.*, (2006) descreveu uma

poligalacturonase com atividade ótima à 40°C, produzida por *Trichoderma harzianum*. Da mesma forma, a temperatura ótima para poligalacturonases de *Bacillus sp.* (KOBAYASHI *et al.*, 2001), *Mucor flavus* (GRADE *et al.*, 2003) e *T. reesei* (MOHAMED *et al.*, 2003) foram cerca de 40 a 50°C.

O pH ótimo da poligalacturonase presente no extrato enzimático apresentou-se relativamente ácido, pH 5,5. MOHAMED *et al.*, (2006) descreve uma poligalacturonase com atividade ótima em pH 5,0, produzida por *Trichoderma harzianum*, assim como a enzima descrita por MOYO *et al.*, (2003), produzida por *Kluyveromyces wickerhamii*, que apresenta atividade ótima também em pH 5,0 e ressalta que os fungos produtores de pectinases possuem pH de atuação na faixa de 3,0 a 5,5. O mesmo pH ótimo (pH 5,0) foi encontrado por poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* (BEHERE *et al.*, 1993), e *Fusarium moniliforme* (NITURE & PANT, 2004).

De acordo com SOARES *et al.*, (1999), que investigaram o efeito do pH na atividade de poligalacturonase de várias espécies de *Bacillus sp.* a maioria das espécies estudadas apresentou pH ótimo para a atividade de poligalacturonase de 6,0. MARTIN *et al.* (2004) observaram atividade máxima de PG por *Moniliella sp* em pH 4,5. SOARES *et al.*, (1999) ao isolarem linhagens de *Bacillus sp* verificaram que o pH ótimo para a produção de PG situa-se entre 6,0 e 7,0.

MARTINS *et al.*, (2007), estudaram a poligalacturonase extracelular do microrganismo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756, e verificaram que a enzima foi otimamente ativa em pH 5,5 e 60-65 ° C.

SILVA *et al.*, (2007), estudando enzimas pectinolíticas (exo-poligalacturonases) produzidas por *Penicillium viridicatum* RFC3, obtendo atividade máxima em pH 6,0 e 60°C. Estes valores de pH e temperatura de exo-PG eram muito semelhantes aos observados para exo-poligalacturonases produzidos por muitos outros fungos, cujo pH ótimo variou de 4,0 a 7,0 e cujas temperatura ideais variaram de 35 a 50 °C (RIOU *et al.*, 1992; BEHERE *et al.*, 1993; KESTER *et al.*, 1996; NOZAKI *et al.*, 1997).

4.3.2 - Estabilidade do extrato enzimático bruto a altas temperaturas

Os resultados obtidos de atividade de PG em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas estão apresentados na Figura 12.

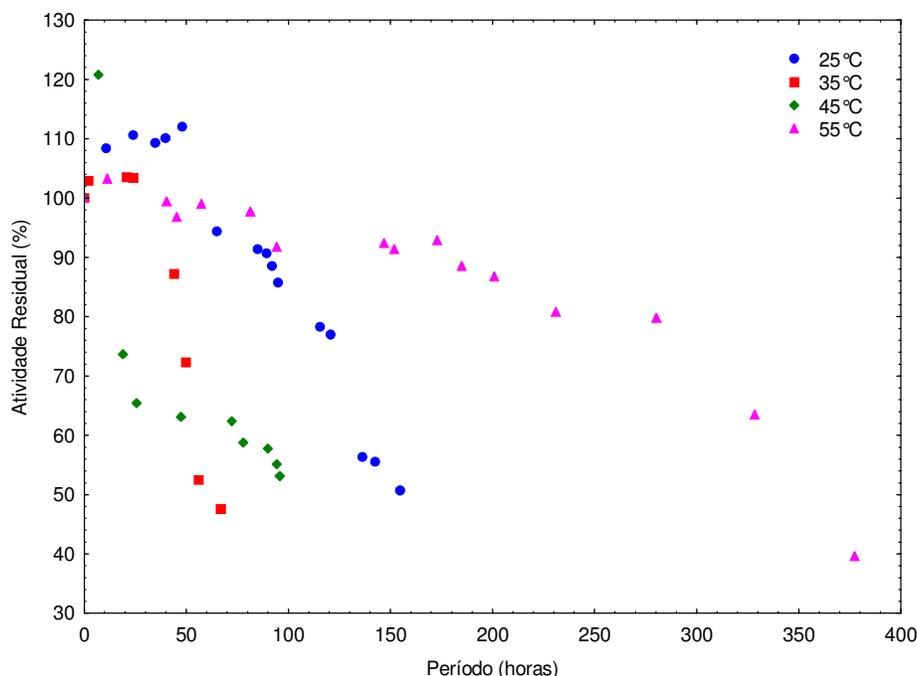


Figura 12 - Comportamento da atividade do extrato enzimático em função da temperatura (25, 35, 45 e 55°C).

A avaliação da estabilidade da PG do extrato bruto foi realizada incubando, a mesma, em diferentes temperaturas, acompanhando o comportamento, através da medida de atividade, em função do tempo. O extrato bruto foi reagido com tampão em pH 5,5, permanecendo incubado a altas temperaturas (25, 35, 45 e 55°C). Os resultados são apresentados na Figura 13, onde se verifica que a maior estabilidade foi a 55°C. Onde esse resultado denota uma boa aplicabilidade industrial da enzima sob temperaturas relativamente altas, como na indústria de sucos e bebidas.

Observa-se também, que uma maior atividade da enzima se dá a 25°C, porém em um tempo de estabilidade de aproximadamente 2 vezes menor em comparativo a temperatura de 55°C.

Ao comparar os resultados da literatura, ASSIS *et al.*, (2004), estimaram que a maioria das pectinases encontra-se ativa por maior tempo no intervalo de temperatura entre 40 e 50°C.

ZHENG & SHETTY (2000) mostraram que a produção de pectinases, a partir de resíduos das indústrias que processam frutas, a enzima se mostrou estável a temperaturas até 50°C sendo completamente inativada a 85°C por 20 minutos.

4.3.3-Estabilidade do extrato enzimático bruto a baixas temperaturas

O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial será mantida ao longo do armazenamento. O extrato enzimático bruto obtido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi estocado em temperaturas de geladeira (4°C), de freezer (-10°C e -80°C) durante 70 dias. Neste período foram determinadas as atividades enzimáticas em intervalos de tempos regulares. Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade a baixas temperaturas (4, -10 e -80°C), são apresentados na Figura 13.

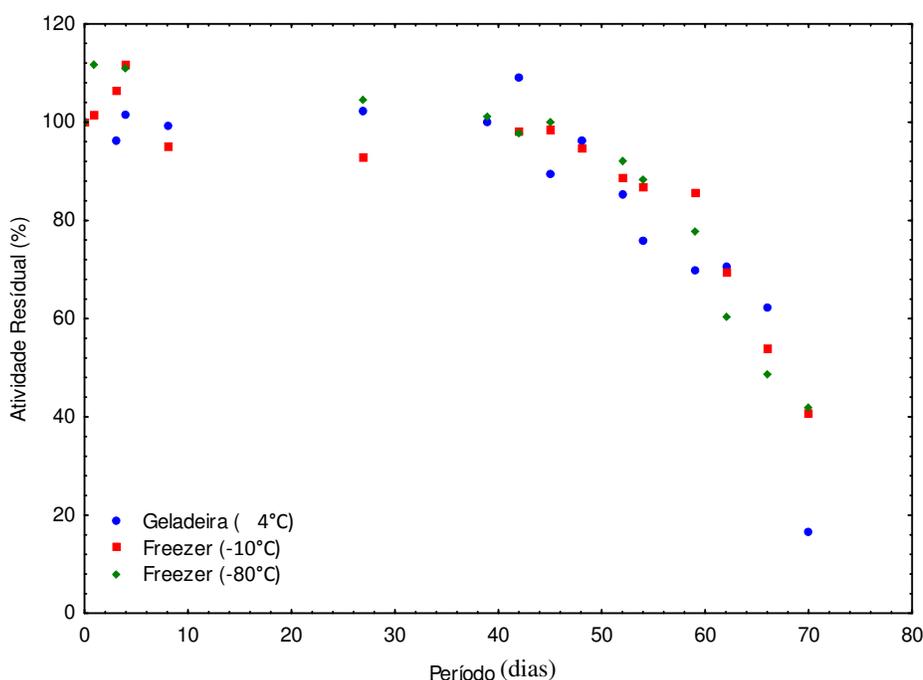


Figura 13 - Comportamento da atividade do extrato enzimático quando submetido a temperatura de estocagem (4,-10 e -80°C).

Observa-se que o comportamento da atividade enzimática (Figura 14) nas 3 diferentes temperaturas, apresentaram semelhanças de queda de atividade residual (%). Pode-se verificar que o extrato obtido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 9642 quando armazenado à baixas temperaturas apresenta um comportamento razoavelmente mais estável, até 40 dias de armazenamento, e após apresenta queda da atividade residual.

4.3.4 - Avaliação do extrato enzimático ao pH

O extrato enzimático bruto foi obtido utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 incubando-se a diferentes valores de pH (5, 7, 9 e 11) a 37°C, acompanhando o comportamento em função do tempo. Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade aos valores de pH são apresentados na Figura 14.

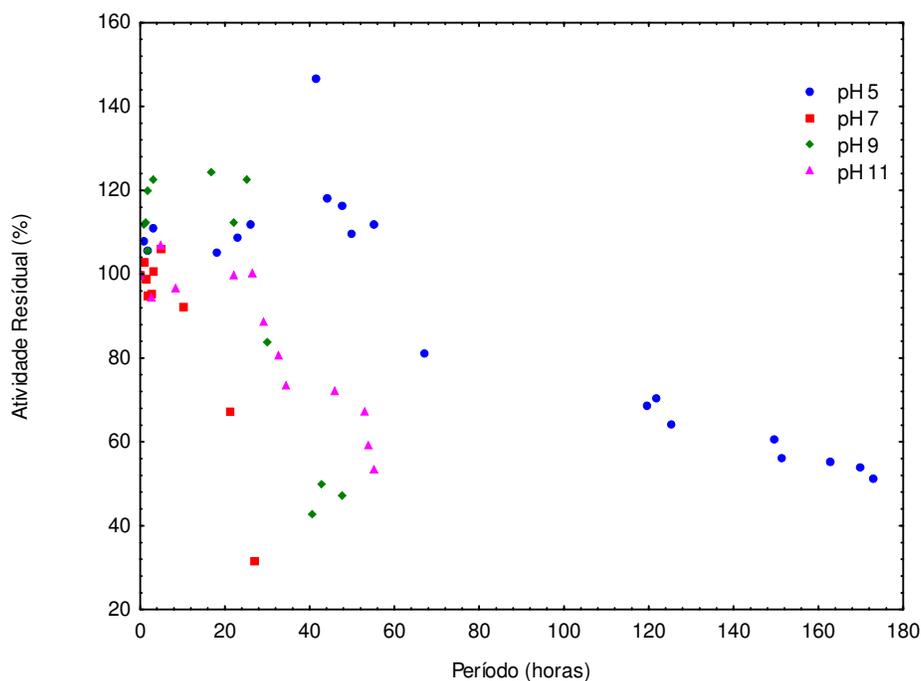


Figura 14 - Atividade poligalacturonásica em função do tempo e do pH do extrato enzimático.

A PG produzida através de fermentação submersa apresentou maior estabilidade em pH 5. Verifica-se na Figura 15 que o pH 7, seria o menos indicado para uma aplicação onde deseja-se uma maior estabilidade da enzima. A atividade residual de 50% da enzima foi em 173 horas. Esse resultado apresenta indícios de poligalacturonases com promissora aplicação em processos industriais ácidos.

Verifica-se na literatura, que a estabilidade do pH também foi determinada para a PG de *Mucor flavus*, onde a enzima foi completamente estável entre pH 2,5 e 6,0 por 20 horas a 20°C, mas em pH 7,0, a estabilidade diminuiu para 60% (GRADE *et al.*, 2003).

HOONDAL (2002) descreve uma poligalacturonase estável numa faixa de pH que abrange do pH 3 a 9, produzida por *Aspergillus fumigatus*.

KOBAYASHI *et al.*, (2001) relataram que PG de *Bacillus sp.* foi muito estável em vários tampões com pH entre 6 e 12, quando incubados a 30°C por 1 horas. ZHENG & SHETTY (2000) mostraram que a enzima se mostrou estável na faixa de pH de 3,0 a 6,5.

MARTINS *et al.*, (2007), estudaram a poligalacturonase extracelular do microrganismo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756, e verificaram que a Poligalacturonase foi estável em pH 5,0 e 5,5 e manteve 33% da atividade inicial, a pH 9,0.

5 – CONCLUSÃO

Através da técnica de planejamentos de experimentos estudou-se a produção de poligalacturonase (PG) pelo micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642 em fermentação submersa. A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

- ✓ Com relação a concentração de esporos, observou-se a maior bioprodução de poligalacturonase de 18,47 U/mL com 5×10^6 esporos/mL em 24 horas.
- ✓ O meio induzido com pectina não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na bioprodução de poligalacturonase.
- ✓ A otimização da produção, resultou uma atividade máxima de 51,82 U/mL, utilizando 32 g/L de pectina, 2 g/L de L-asparagina, 0,06 g/L de fosfato de potássio, 1,0 g/L de sulfato de ferro, 180 rpm, 25°C e pH inicial de 5,5.
- ✓ Na avaliação cinética, a maior atividade da enzima foi obtida em 27 horas de bioprodução com 44 U/mL.
- ✓ A avaliação do pH e temperatura ótimos mostrou que a maior atividade (72,93U/mL) de PG foram obtidos a 37°C e pH de 5,5.
- ✓ A maior estabilidade a altas temperaturas (25°C, 35°C, 45°C e 55°C) foi obtida em 55°C e pH 5,0, durante aproximadamente 370 e 175 horas respectivamente.
- ✓ A baixas temperaturas (4°C, -10°C e -80°C), a estabilidade manteve-se por um período de 40 dias de armazenamento.
- ✓ Os resultados apresentados dão indícios de promissoras aplicações em processos industriais ácidos utilizando poligalacturonases. Onde esses resultados denotam uma boa aplicabilidade industrial da enzima sob temperaturas relativamente altas, como na indústria de sucos e bebidas.

6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Através da experiência adquirida neste trabalho acerca da produção de poligalacturonase por Fermentação Submersa utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio sintético, pode-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

- ✓ Aumento de escala em biorreator da condição otimizada da bioprodução de poligalacturonase com pectina cítrica como substrato.
- ✓ Testar substratos agroindustriais (cascas de laranja, mosto de uva, farelos de trigo e soja, cascas de maracujá, etc., assim como também combinações destes substratos) para produção de poligalacturonase em meio submerso. Caracterizar o substrato a ser utilizado, antes e depois da esterilização.
- ✓ Otimizar a produção de poligalacturonase com o melhor substrato agroindustrial.
- ✓ Caracterizar a poligalacturonase produzida por substratos agroindustriais.
- ✓ Fazer fermentações em estado sólido com o mesmo micro-organismo utilizado na fermentação submersa e o mesmo substrato agroindustrial para fins de comparação entre os tipos de fermentações.
- ✓ Estudar métodos de purificação da enzima produzida em condições otimizadas para aumentar a atividade da mesma.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v.33, n.1, p. 21- 28, 1998.
- ASSIS, S. A.; FERREIRA B. S.; FERNANDES, P.; GUAGLIANONI, D.G., CABRAL J.M.S., OLIVEIRA, O.M.M.F. Gelatin-immobilized pectinametilsterase for production of low methoxyl pectina. *Food Chemistry* v.86, n.3, p. 333-337, 2004.
- AUNSTRUP, K. "Production, isolation and economics of extracellular enzymes". In: Wingard Jr., L.B., Katchalski-Katzir, E., Goldstein, L. (eds.), *Enzyme Technology*, v.2, Applied Biochemistry and Bioengineering, Academic Press, p. 28-70, 1979.
- BEHERE, A.; SATYANARAYAN, V.; PADWAL-DESAI, S. R. Separation and limited characterization of three polygalacturonase of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbial Technology*, Woburn, v.15, n.2, p.158-161, 1993.
- BENEN, J.A.; VISSER, J. Poygalacturonases. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. e Wong, D.W.S. *Handbook of food enzymology*, v.69, p.857-866, 2003.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v.18, n.5, p.355–383, 2000.
- BLANDINO, A.; IQBALSIAH, T.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.58, p. 164–169, 2002.
- BOAS, E.V.B.; CHITARRA A.B.; MALUF, W.R.; CHITARRA, M.I.F. Modificações Texturais de tomates Heterozigotos no Loco Alcobaça. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.7, p.1447, 2000.
- BORZANI, W.; LIMA, U.A., AQUARONE, E., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia industrial: Fundamentos*. São Paulo: Edgard Blücher v.1, 2001.
- BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. *Xylanase* and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.42, n.1, p. 98-101, 2007.

- BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GOMEZ, R. J. H. C., PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. Ciências Agrotécnicas, v.24 (Edição Especial), p.137-152, 2000.
- CASTILHO, L. R. Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.
- CORDEIRO C.A.M., MARTINS M.L.L., Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus sp.* e algumas de suas propriedades , Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009.
- COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8, Process Biochemistry, v.35, n.3, p. 255 – 261, 2000.
- CRUEGER, W & CRUEGER, A. Biotecnologia – Manual de Microbiologia Industrial. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1993.
- DARTORA, A. B., BERTOLIN T.E., BILIBIO D., SILVEIRA M. Evaluation of fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation. Naturforsch, UK, v.57, p.666 -670, 2002.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; Fermentação em estado semi-sólido. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v.2, cap.13, p.250-254, 2001.
- DINU, D., NECHIFOR, T.M., STOIAN, G., COSTACHE, M., DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. Journal of Biotechnology v.131, p.128–137, 2007.
- FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. International Biodeterioration & Biodegradation, v.52, n.4, p. 223-227, 2003.

- FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. Anais...Recife: ____, 2005. CD.
- FREIRE, D.M.G. Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.1996.
- GAVA, A. J. Princípios da Tecnologia de Alimentos. São Paulo. Ed. Nobel, 1998.
- GALIOTOU & PANAYOTOU, M. P. R.; KAPANTAI, M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. Lett. Appl. Microbiol., v.17, p.145–148, 1997.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, v.30, n.1, p.136 – 145, 2007.
- GRADE, R.V., VAN DRIESSCHE, G., VAN BEEUMEN, J., BHAT, M.K. Purification, characterization and mode of action of an endopolygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. Enzyme Microbial Technology v.32, p. 321–330, 2003.
- GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. Process Biochemistry, USA, v. 38, p. 987 – 996, 2003.
- HENNIES, P. T. Produção de pectinases de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology v.59, n.4-5 p. 409 – 418, 2002.
- ILLANES, A. Biotecnología de Enzimas. Chile, Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.

- ILLANES A., Stability of biocatalysts, EJB Electron Journal Biotechnol , p. 2, 1999.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry v.40, Issue 9, p. 2931-2944, 2005.
- KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Boiresource Technology, v.77, p.215-227, 2000
- KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Boiresource Technology, v.77, p. 215-227, 2001.
- KESTER, H. C. M.; KUSERS-VAN-SOMEREN, M. A.; MULLER, Y.; VISSER, J. (1996): Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. Eur. J. Biochem. v.240, p.738–746.
- KOBAYASHI, T.; HIGAKI, N.; SUZUMATSU, A.; SAWADA, K.; HAGIHARA, H.;KAWAI, S.; ITO, S. Purification and properties of a highmolecular - weight, alkaline exopolygalacturonase from strain of *Bacillus*. Enzyme Microbial Technology . v.29, p.70–75.; 2001.
- KRATCHANOVA, M.; PAVLOVA E.; PANCHEV, I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. Carbohydrate Polymers 56, Issue 2, p. 181-185, 2004.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. v.3. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.
- MALAJOVICH, M.A. Biotecnologia. Rio de Janeiro: Axcel Books, p.344, 2004.
- MALLER. A.; Dissertação de mestrado, produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*. 2008.
- MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae*. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.47, n.5, p.693-702, 2004.

- MARTIN, N. Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase. 2006. Dissertação (Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.
- MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal of strains in solid – state fermentation using agro – industrial bioproduct. *Brazilian Archives Biology and Technology*, v. 47, p. 813 – 819, 2004.
- MARTIN, N.; GUEZ, M. A. U.; SILVA, R.; GOMES, E. Utilização de resíduos agroindustriais em Fermentação em Estado Sólido (FES) para avaliar a produção de Poligalacturonase (PG) pelo fungo termofílico *Rhizomucor sp* N31. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. Anais... Curitiba: ____, 2007. CD.
- MARTINS E.S.; LEITE R.S.; SILVA D.; DA SILVA R.; GOMES E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie Leew* 2007; 91:291–9.
- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; MARTIN, N.; MONTEIRO, A. C.; LEITE, R. S.; SILVAR., R.; GOMES, E. Produção e caracterização de uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. Anais... Recife: ____, 2005. CD.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, p. 426 - 428, 1959.
- MING CHU, I.; LEE, C.; LI, T. S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v.14, n.4, p.755-761, 1992.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v.68, p.61 – 138, 2000.

- MOYO, S.; GASHE B.A.; COLLISON E.K.; MPUCHANE S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *International Journal Food Microbiology*, v.85, p.87–100, 2003.
- MOHAMED, S.A.; CHRISTENSEN, T.M.I.E.; MIKKELSEN, J.D.; 2003. New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. *Carbohydrate Research*. v.338, p.515–524.
- MOHAMED, S.A; FARID, N.M.; HOSSINY, E.N.; BASSUINY, R.I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *Journal Biotechnology*, v.127, p.54-64, 2006.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v.16, n.1, p. 57- 67, 2003.
- NITURE, S.K., PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiology Research*. v.159, p.305–314, 2004.
- NOZAKI, K., MIYAIRI, K., HOZUMI, S., FUKUI, Y., OKUNO, T. Novel exopolygalacturonases produced by *Alternaria mali*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* v.61, p.75–80, 1997.
- PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. Anais... Florianópolis: ___, 2003. CD.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v.77, p.149-162, 1999.
- PAULA, B.; MORAES, I. V. M; CASTILHO, C. C.; GOMES, F. S.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Melhoria na eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação dos processos de microfiltração e enzimático. *Boletim CEPPA*, v.22, n.2, p. 311-324, 2004.

- PEREIRA, M. S. A. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por, *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistemas de duas fases aquosas. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal.
- PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arábica* L.) colhido quatro estágios de maturação. *Ciência Agrotecnica*, Lavras, v.24, n.4, p.1079-1083, 2000.
- QUIROGA E. N.; SGARIGLIA M. A.; MOLINA C. F.; SAMPIETRO D. A.; SOBERÓN J. R.; VATTUONE M. A. – Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*- mycological research v.113, p.1404-1410, 2009.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos. Pelotas: Universitária/UFPeL, 1996. v.1.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos Processos Fermentativos. v.3. Editora e Gráfica Universitária UFPeL. Pelotas. 2000.
- RESENDE, J.M.; CHITARRA, M.I.F.; MALUF, W.R.; CHITARRA, A.B.; SAGGIN JÚNIOR. O.J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. *Horticultura Brasileira* v.22, n.2, p.206-212, 2004.
- RIOU, C.; FREYSSINET, G. and FEURE, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Environmental Microbiology*, v.58, p.578-583, 1992.
- ROKAS, A., PAYNE, G., FEDOROVA, N.D., BAKER, S.E., MACHIDA, M., YU, J., GEORGIANNA, D.R., DEAN, R.A., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T.E., WORTMAN, J.R., MAITI, R., JOARDAR, V., AMEDEO, P., DENNING, D.W., NIERMAN, W.C., 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus* *Studies Mycology*. v.59, p.11–17., 2007.
- ROMBOUTS, F. M., & PILNIK, W. Pectic enzymes. In A. H. Rose (Ed.), *Microbial enzymes and bioconversions* (p. 227–282). London: Academic Press, 1980.

- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T; HALLAERT,J.; VANDAMME, E.J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology* v.39 p.231-94, 1993.
- SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, cap.1, p. 85-95, 1996.
- SILVA, A. P. V., MAIA, G.A.; OLIVEIRA, G.S.F.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M. Estudo da produção do suco clarificado de caju (*Spondias lútea L.*). *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, v.19, n.1, 1999.
- SILVA D., SILVA M. E., SIMÕES R., LEITE R., DA SILVA R., FERREIRA V., GOMES E.- Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation - *Process Biochemistry* v.42, p. 1237–1243, 2007.
- SILVA EG, BORGES MF, MEDINA C, PICCOLI RH, SCHWAN RF. Pectinolytic enzymes secreted by yeast from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*; 5:859–65, 2005.
- SILVA, J. D. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). São Paulo: Editora UFV, 1998, p.166.
- SOARES, M. M. C. N.; da SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains or pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 4, p. 299-303, 1999.
- SOLIS & PEREYRA S.; FAVELA & TORRES E.; VINIEGRA & GONZÁLES G.; GUTIÉRREZ & ROJAS, M. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology.*, v.41, p.36-41, 1993.

- TARI, C.; GOGUS, N.; TOKATL, F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme Microbiol Technology*, 40: 1108–1116, 2007.
- TEIXEIRA, M.F.S., LIMA FILHO, J.L., DURAN, N. (2000) Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Review Microbiology*. 31: 286 -290.
- TERZI, S. C.; CARVALHO, C. V. P.; OLIVEIRA, A. C. P.; COURI, S. Influência da variação da concentração de inoculo do *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção de enzima poligalacturonase. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. Anais... Florianópolis: ____, 2003. CD.
- THAKUR, B.R.; SING, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.37, n.1, p. 47-73, 1997.
- TREVAN, M.D., Boffey, S.; Goulding, K. H. y Stanbury, P. *Biotechnology: principios biológicos*. Zaragoza: Acribia, 1990.
- TRIBLESS, T. B. Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- UENOJO, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- UENOJO, M.; PASTORE, Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives; *Química Nova*. v.30, n.2 São Paulo, 2007.
- VORAGEM, F.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. Chemistry and enzymology of pectins. In: McCleary, V.; Prosky, L., Edtors, 2001. *Advanced dietary fibre technology*, Blackwell Science, London, p.379-398, 2001.
- WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (eds. Fogarty, W. M. and Kelly, C. T.) Appl. Science, London e New York. p. 133-175, 1991.

ZHENG Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process biochemistry*, v.35, p.825-830, 2000.

www.novozymes.com.br, acesso em 2009.

www.lyven.com.br, acesso em 2009.