UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES. URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa

JAMILE ZENI

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

SETEMBRO, 2011

Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa

Jamile Zeni

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Campus de Erechim.

Comissão Julgadora:

_____

Prof. Eunice Valduga, D. Sc

Orientadora

_____

Prof. Geciane Toniazzo, D. Sc.

Orientadora

_____

Prof. Ivana Greice Sandri, D. Sc

UCS – Campus Caxias do Sul

_____

Prof. Raquel Cristine Kuhn, D. Sc

UDESC – Campus Pinhalzinho

_____

Prof. Giovana Cristina Ceni, D. Sc

URI – Campus de Erechim

_____

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc

URI – Campus de Erechim

Erechim, Setembro de 2011.

Dedicatória

Aos meus pais,
Leila e Ilário Zeni,
pelo amor e exemplo de vida!
Obrigada por me ensinarem a nunca desistir.

Atritos

Você já viu a diferença que há entre as pedras
que estão na nascente de um rio,
e as pedras que estão em sua foz?

As pedras na nascente são toscas,
pontiagudas, cheias de arestas.
À medida que elas vão sendo carregadas
pelo rio sofrendo a ação da água
e se atritando com as outras pedras,
ao longo de muitos anos,
elas vão sendo polidas, desbastadas.

Assim também agem nossos contatos humanos.
Sem eles, a vida seria monótona, árida.

Passar pela vida sem se permitir
um relacionamento próximo com o outro,
é não crescer, não evoluir, não se transformar.
É começar e terminar a existência
com uma forma tosca, pontiaguda, amorfa.

Quando olho para trás,
vejo que hoje carrego em meu ser
várias marcas de pessoas
extremamente importantes.

Pessoas que, no contato com elas,
me permitiram ir dando forma ao que sou,
eliminando arestas,
transformando-me em alguém melhor,
mais suave, mais harmônico, mais íntegro.

Outras, sem dúvidas,
com suas ações e palavras
me criaram novas arestas,
que precisaram ser desbastadas.

Faz parte...
Reveses momentâneos
servem para o crescimento.
A isso chamamos experiência.

"*Roberto Crema*"

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Ilário e Leila pelo amor, carinho, apoio, confiança e incentivo em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã Camila e sobrinha Gabriela pelo amor.

Ao Renato pelo amor, carinho, apoio e compreensão dedicados a mim desde o nosso primeiro encontro.

Às minhas orientadoras Eunice Valduga e Geciane Toniazzo, pela orientação, apoio e tranqüilidade transmitidos em todos os momentos, mas principalmente pela amizade e confiança.

As colegas de trabalho Jonaina, Éllin, Lídia, Karine, Ana e Márcia, pela ajuda em todos os momentos, tornando o trabalho de pesquisa mais agradável.

As colegas do Laboratório Rosicler, Simoni, Marceli, Gracieli e Silvana pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

As minhas queridas amigas Daniela Remonatto, Gracieli Hemming, Claudia Toquetto, e minha querida prima Zenaide pela amizade, carinho e apoio incondicional em todas as horas.

A todos os funcionários e professores do Curso de Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todas as outras pessoas que fizeram parte de minha vida até este momento.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa

Jamile Zeni

Setembro/ 2011

Orientadoras: Geciane Toniazzo e Eunice Valduga.

O objetivo do presente estudo foi a produção de enzimas pectinolíticas visando a maximização e/ou otimização da produção das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectina liase (PMGL), pectinametilesterase (PME), pectato liase (PGL) e pectinesterase (PE) pelo micro-organismo de maior potencial pectinolítico. Os micro-organismos foram isolados de amostras de resíduos agroindustriais, laranja, mamão, pêssego, melão, goiaba, banana, solo, farinha de trigo e de produtos processados em decomposição. No *screening* foram isolados e selecionados 92 micro-organismos e além destes foram testadas 15 linhagens identificadas. As técnicas de microcultivo e RAPD foram utilizadas como ferramenta para pré-identificação dos 18 micro-organismos isolados de maior potencial pectinolítico, sendo possível identificar 2 bactérias e 16 fungos filamentosos, sendo 11 pertencem ao gênero *Penicillium* sp., 3 cepas ao gênero *Aspergillus* sp. uma ao *Rhizopus* sp. e outra ao *Cephalosporium* sp.. Com a análise de RAPD (Random Amplified Polymorfhic DNA) foi possível concluir que os micro-organismos isolados e selecionados são de espécies ou até gêneros diferentes não apresentando duplicação de cepas. O micro-organismo de maior produção pectinolítica codificado como D2 foi identificado por técnicas de biologia molecular como *Penicillium brasilianum*, o qual foi utilizado nos ensaios de bioprodução de pectinases. Um planejamento completo de segunda ordem possibilitou a maximização da bioprodução de exo-PG em frascos agitados obtendo-se um teor de 52,79 U/mL, com concentração de 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 30°C, 180 rpm, 48 horas e $pH_{inicial}$ de 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL. Em biorreator obteve-se atividade de exo-PG máxima de 53,87 U/mL, com 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 30°C, 180 rpm, aeração de1,5 v/v, 36 horas e $pH_{inicial}$ de 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL. A caracterização parcial do extrato enzimático bruto de exo-PG apresentou condições de pH e temperatura ótimos de 4,5 e 40°C, respectivamente. A maior estabilidade exo-PG foi obtida em pH 5,0 e temperaturas de 55°C e -80°C de armazenamento. A energia de ativação (Ed) para a reação de desativação foi de 5,76 kJ/mol, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 693,10 horas. A máxima produção de PMGL em frascos agitados foi de 9,0 U/mL em meio de bioprodução composto de 33 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio nas condições de 180 rpm, 30°C, 72 horas, $pH_{inicial}$ 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL. A caracterização parcial do extrato enzimático bruto da PMGL apresentou condições de

pH e temperatura ótimos de 5,5 e 37°C, respectivamente. Um planejamento completo de primeira ordem possibilitou a maximização da bioprodução da PME em frascos agitados obtendo-se um teor de 4,8 U/mL com 32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro, $5x10^6$ esporos/mL, 30 C, 27 horas, $pH_{inicial}$ 5,5 e 180 rpm. Empregando coadjuvante de medida de atividade de PME, o sal $CaCl_2$ a 0,5 M e 0,5% de pectina cítrica permitiu um incremento de 2,3 vezes na atividade. A caracterização parcial do extrato da PME indicou maior atividade (36 a 40 U/mL) em pH ótimo de 9 a 11 e em uma ampla faixa de atuação da temperatura, 30 a 80°C. Os extratos enzimáticos pectinolíticos brutos (exo-PG, PMGL e PME) apresentam potencialidades de aplicação na indústria de sucos, sendo que no suco de pêssego, ao empregar tratamento enzimático com 0,5 % (v/v) de extrato enzimático bruto da exo-PG, a 40°C durante 60 minutos, foi verificada a maior eficácia na redução de viscosidade (12 %), turbidez (14 %) e na clarificação (27 %).

Palavras-Chave: *Penicillium brasilianum,* pectinases, fermentação submersa, estabilidade e aplicação.

Abstract of Thesis submitted to Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering (D.Sc.)

Production and partial characterization of pectinas obtained by a new strain of *Penicillium brasilianum* in submerged fermentation

Jamile Zeni

September/ 2011

Advisors: Geciane Toniazzo and Eunice Valduga.

The objective of this work was to carry out the screening of potential microorganisms for the production of pectinolytic enzymes aiming at maximizing and/or optimizing the production of exo-polygalacturonases (exo-PG), pectin-lyases (PMGL), pectin-methyl-esterases (PME), pectate-lyases (PGL) and pectin-esterases (PE) by the micro-organism of higher pectinolytic potential. The microorganisms were isolated from samples of agroindustrial residues, orange, papaya, peach, melon, guava, banana, soil, wheat flour and processed products in decomposition. From the screening, 92 micro-organisms were isolated and screened. Fifteen other identified strains were also tested. The microcultive and RAPD (Random Amplified Polymorfhic DNA) techniques were used as tool for the pre-identification of the 18 more promising isolated micro-organisms, in terms of pectinolytic activity. It was possible to identify 2 bacteria and 16 filamentous fungi, 11 belonging to the *Penicillium* sp. genus, 3 were *Aspergillus* sp., one was identified as *Rhizopus* sp. and the last one as belonging to the genus of *Cephalosporium* sp. The RAPD analysis permitted to conclude that the isolated and screened microorganisms belong to different species and genus, did not presenting duplication of strains. The microorganism of highest pectinolytic activity (coded as D2) was identified by molecular biology techniques as *Penicillium brasilianum*. This microorganism was further used in the experiments for pectinases bioproduction. A second order full experimental design made possible to maximize the bioproduction of exo-PG in shaken flasks, giving a content of 52.79 U/mL, using 32 g/L of citric pectin, 10 g/L of yeast extract and 0.5 g/L of magnesium sulfate, at 30°C, 180 rpm, 48 hours and initial pH of 5.5 and $5x10^6$ spores/mL. In bioreactor, the maximum exo-PG activity was 53.87 U/mL, using 32 g/L of citric pectin, 10 g/L of yeast extract and 0.5 g/L of magnesium sulfate, at 30°C, 180 rpm, aeration of 1.5 v/v, 36 hours and initial pH of 5.5 and $5x10^6$ spores/mL. The partial characterization of the crude exo-PG enzymatic extract showed optima pH and temperature of 4.5 and 40°C, respectively. The highest stability of exo-PG was obtained at pH 5.0 and 55°C and under storage at -80°C. The activation energy (Ed) for the deactivation reaction was of 5.76 kJ/mol, giving a half-life time ($t_{1/2}$) of 693.10 hours. The maximum production of PMGL in shaken flasks was of 9.0 U/mL in culture medium composed by 33 g/L citric pectin, 30 g/L yeast extract, 2 g/L potassium phosphate at 180 rpm, 30°C, 72 hours, initial pH 5.5 and inoculums concentration of $5x10^6$ spores/mL. The partial characterization of the crude PMGL enzymatic extract presented optima conditions of pH and temperature of 5.5 and 37°C, respectively. A first order full experimental design made possible the maximization of PME bioproduction in shaken flasks, giving an activity of 4.8 U/mL using 32 g/L of pectin, 30 g/L of yeast extract 8 g/L of potassium phosphate and 0.02 g/L of iron sulfate, $5x10^6$ spores/mL, 30°C, 27 hours, initial pH 5.5 and 180 rpm. Using adjunct of PME

measurement activity, $CaCl_2$ 0.5 M and 0.5 % of citric pectin, an increase of 2.3 times in the enzyme activity was observed. The partial characterization of crude PME enzymatic extract showed higher activities (36 to 40 U/mL) in pH values from 9 to 11 and in a wide range of temperature, from 30 to 80°C. The crude enzymatic extracts (exo-PG, PMGL and PME) presented potential of application in juice industries, for example, for peach juice, the use of 0.5 (v/v) of crude extract of exo-PG, 40°C and 60 minutes, led to a reduction of 12 % in the viscosity, 14 % in the turbidity and 27 % in terms of juice clarification.

Keywords: *Penicillium brasilianum,* pectinases, submerged fermentation, enzyme stability and pectinases application.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS i
RESUMO ii
ABSTRACT iv
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE TABELAS xi
LISTA DE ABREVIATURAS xvi
1. INTRODUÇÃO 1
2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. Substâncias pécticas 3
2.2. Enzimas pectinolíticas: classificação e mecanismos de ação 4
2.3. Produção de pectinases 10
2.4. *Screening* de micro-organismos produtores de pectinases 15
2.5. Caracterização das enzimas pectinolíticas 17
2.6. Aplicação industrial das pectinases 18
2.7. Considerações finais 21
3. MATERIAL E MÉTODOS 22
3.1. *Screening* de micro-organismos pectinolíticos 22
3.1.1. Isolamento e manutenção dos micro-organismos 22
3.1.2. Seleção de micro-organismos produtores de pectinases 23
3.1.3.Identificação dos micro-organismos 24
3.2.Bioprodução de pectinases 28
3.2.1. Cinética do tempo de reação na medida de atividade das pectinases 28
3.2.2.Efeito da concentração de esporos 28
3.2.3. Screening de variáveis para a bioprodução de pectinases 29
3.2.4. Exo-poligalacturonase (exo-PG) 29
3.2.4.1. Produção da exo-poligalacturonase em frascos agitados 29
3.2.4.2. Produção de exo-poligalacturonase em biorreator 30
3.2.4.3. Estudo cinético da bioprodução de exo-poligalacturonase (exo-PG) 31
3.2.5. Pectina Lise (PMGL) 31
3.2.5.1. Produção de pectina liase em frascos agitados 31
3.2.5.2. Estudo cinético da bioprodução de pectina liase (PMGL) 31
3.2.6. Pectinametilesterase (PME) 32

3.2.6.1. Produção de pectinametilesterase em frascos agitados..... 32
3.2.6.2. Estudo cinético da bioprodução de pectinametilesterase (PME)..... 32
3.2.6.3. Efeito das concentrações de sais no meio reacional da medida de atividade da PME..... 33
3.2.6.4. Efeito da concentração de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME..... 33
3.2.7. Avaliação das diferentes pectinases nos extratos enzimáticos brutos maximizados..... 33
3.3. Caracterização parcial das pectinases..... 33
3.3.1. Avaliação da temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto..... 34
3.3.2. Avaliação da temperatura de estabilidade..... 35
3.3.3. Avaliação do extrato enzimático bruto quanto a estabilidade ao pH..... 35
3.3.4. Determinação da energia de ativação (Ea)..... 35
..3.4. Potencial de aplicação das pectinases em suco..... 36
3.5. Determinações analíticas..... 36
3.5.1. Atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG)..... 36
3.5.2. Atividade de pectina liase (PMGL)..... 37
3.5.3. Atividade de pectato liase (PGL)..... 37
3.5.4. Atividade de pectinaesterase (PE)..... 38
3.5.5. Atividade de pectinametilesterase (PME)..... 38
3.5.6. pH..... 38
3.5.7. Carbono orgânico total (COT)..... 39
3.5.8. Macro e microminerais..... 39
3.5.9. Avaliação de características físico-químicas do suco..... 39
3.5.10. Tratamentos estatísticos..... 40
4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 41
4.1. *Screening* de micro-organismos pectinolíticos..... 41
4.1.1. Isolamento e seleção dos micro-organismos..... 41
4.1.2. Identificação dos micro-organismos..... 45
4.2. Bioprodução de pectinases..... 48
4.2.1. Cinética do tempo de reação na medida de atividade das pectinases..... 48
4.2.2. Efeito da concentração de esporos..... 50
4.2.3. *Screening* de variáveis para a bioprodução de pectinases..... 53

4.2.4. Exo-poligalacturonase (exo-PG)..... 59
4.2.4.1. Produção da exo-poligalacturonase em frascos agitados..... 59
4.2.4.2. Estudo cinético da bioprodução de exo-poligalacturonase (exo-PG) 63
4.2.4.3. Produção da exo-poligalacturonase em biorreator..... 66
4.2.4.4. Caracterização parcial da exo-poligalacturonase (exo-PG)..... 69
4.2.5. Pectina liase (PMGL)..... 78
4.2.5.1. Produção de pectina liase em frascos agitados..... 78
4.2.5.2. Estudo cinético da bioprodução de pectina liase (PMGL)..... 83
4.2.5.3. Caracterização parcial da pectina liase (PMGL)..... 86
4.2.6.Pectinametilesterase (PME)..... 90
4.2.6.1. Produção de pectinametilesterase em frascos agitados..... 90
4.2.6.2. Estudo cinético da bioprodução de pectinametilesterase (PME).... 93
4.2.6.3. Efeito das concentrações de sais no meio reacional da medida de atividade da pectinametilesterase (PME)..... 96
4.2.6.4. Efeito da concentração de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da pectinametilesterase (PME)..... 97
4.2.6.5. Caracterização parcial da pectinametilesterase (PME)..... 98
4.2.7. Avaliação das diferentes pectinases nos extratos enzimáticos brutos maximizados..... 102
4.2.8. Potencial de aplicação das pectinases em suco de pêssego..... 103
4.2.9. Considerações finas..... 106
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... 107
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 110
7. APÊNDICES..... 128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modo de ação da pectinesterase. A seta indica o local de reação da enzima na substância péctica..... 5

Figura 2 Modo de ação da pectina liase na substância péctica..... 6

Figura 3 Modo de ação da poligalacturonase. A seta indica o local de reação da enzima na substância péctica..... 8

Figura 4 Mecanismo de reação da pectinametilesterase sobre a pectina..... 9

Figura 5 Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina..... 9

Figura 6 Preparo da lâmina para identificação dos micro-organismos..... 24

Figura 7 Aspectos visuais do fungo filamentoso *Penicillium* sp: a) Características da morfologia, b) Microcultivo, respectivamente..... 26

Figura 8 Aspecto visual da massa celular do *Penicillium* sp. (a) formação de *pellets* (b) dessecada, respectivamente..... 27

Figura 9 Atividade de exo-poligacturonase (U/mL) dos micro-organismos *A.niger* ATCC 9642 , *A. niger* ATCC 16404 , *A. niger* ATCC 1004 , *P. putida* e dos isolados D2, W24, W23, W43, K3 (B), G6 (B), L4, J6, W18, W35, H8,T2, H9, L1,B9, W12, W44 e W52, nas 24, 48, 72 e 96 horas de bioprodução..... 42

Figura 10 Gel de agarose (1,4 %) demonstrativo obtido com o *primer* OPY-15 para os micro-organismos pectinolíticos..... 44

Figura 11 Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD dos fungos produtores de exo-poligalacturonase (exo-PG)..... 45

Figura 12 Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD das bactérias produtores de exo-poligalacturonase (exo-PG)..... 46

Figura 13 Produção de exo-poligalacturonase (exo-PG) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum*. 49

Figura 14 Produção de pectina liase (PMGL) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum*..... 49

Figura 15 Produção de pectinametilesterase (PME) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum*..... 50

Figura 16 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a produção de exo-poligalacturonase (U/mL)..... 53

Figura 17 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a produção de pectina liase (U/mL)..... 54

Figura 18 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a produção de pectinametilesterase (U/mL)..... 55

Figura 19 Superfícies de resposta e curvas de contorno para bioprodução de exo-PG (U/mL) em função da concentração de extrato de levedura e pectina (a), concentração de pectina e sulfato de magnésio (b) e concentração de sulfato de magnésio e extrato de levedura (c)..... 60

Figura 20 Estudo cinético da bioprodução de exo-PG em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L) e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono, nitrogênio e minerais pelo tempo (horas) (b)..... 62

Figura 21 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial completo 2^2, para a produção de exo-poligalacturonase (U/mL) em biorreator..... 65

Figura 22 Estudo cinético da atividade de exo-poligalacturonase em todos os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 em biorreator..... 66

Figura 23 Aspecto do cultivo do *Penicillium brasilianum* em biorreator após 24 horas (a), 48 horas (b) e 96 horas (c) de bioprodução de exo-PG..... 67

Figura 24 Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de exo-PG (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH. 70

Figura 25 Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG sumbetido a temperaturas de 25, 35, 45 e 55°C..... 72

Figura 26 Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG armazenado a 4, -10 e -80 °C..... 74

Figura 27 Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG submetidos a valores de pH de 4, 5, 6, 7 e 9 a 40°C..... 75

Figura 28 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^3 para o pH..... 79

Figura 29 Curvas de contorno e superfícies de resposta para bioprodução de PMGL (U/mL) em função da concentração de extrato de levedura e pectina (a), concentração de pectina e fosfato de potássio (b) extrato de levedura e fosfato de potássio (c)..... 81

Figura 30 Estudo cinético da bioprodução de PMGL em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L) e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono, nitrogênio e minerais pelo tempo (horas) (b)..... 83

Figura 31 Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade de PMGL (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH..... 86

Figura 32 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^3 em função do pH..... 91

Figura 33 Estudo cinético da bioprodução de PME em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L), nitrogênio e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono e minerais pelo tempo (horas) (b)..... 93

Figura 34 Determinação da atividade da PME avaliando diferentes concentrações de pectina cítrica no meio reacional..... 95

Figura 35 Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PME (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ocorrência e principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas.... 10

Tabela 2 Produção de pectinases por diferentes cepas microbianas..... 13

Tabela 3 Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman para a produção das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinesterase (PE) e pectato liase (PGL), respectivamente..... 29

Tabela 4 Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 completo para produção de exo-PG..... 30

Tabela 5 Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 na bioprodução de exo-PG em biorreator..... 30

Tabela 6 Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para produção de PMGL..... 31

Tabela 7 Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para produção de PME..... 32

Tabela 8 Variáveis e níveis utilizados no planejamento completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas exo-PG e PMGL..... 34

Tabela 9 Variáveis e níveis utilizados no planejamento completo 2^2 de temperatura e pH ótimos da enzima PME..... 34

Tabela 10 Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada *primer* utilizado para os micro-organismos pectinolíticos..... 44

Tabela 11 Atividade da exo-poligalacturonase (U.A) durante 40 minutos de reação..... 47

Tabela 12 Atividade da pectina liase (U/mL) durante 120 minutos de reação..... 48

Tabela 13 Matriz do planejamento do tipo Plackett & Burmann (valores reais e codificados) e respostas em produção das enzimas exo-poligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinesterase (PE) e pectato liase (PGL), respectivamente..... 52

Tabela 14 Matriz do planejamento fatorial 2^3 completo (valores codificados e reais) e resposta em produção de exo-poligalacturonase e pH..... 57

Tabela 15 Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de exo-poligalacturonase..... 58

Tabela 16 Análise de variância para a bioprodução de exo-PG do planejamento fatorial completo 2^3..... 58

Tabela 17 Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em produção de exo-poligalacturonase e pH em biorreator..... 64

Tabela 18 Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade exo-poligalacturonásica em função de temperatura e pH ótimos..... 68

Tabela 19 Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de exo-poligalacturonase em função de temperatura e pH ótimos..... 69

Tabela 20 Análise de variância para a atividade de exo-PG do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos..... 69

Tabela 21 Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da exo-PG obtido pelo *P. Brasilianum*..... 73

Tabela 22 Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resposta em produção de pectina liase (U/mL) e pH..... 66

Tabela 23 Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2^2 para atividade de PMGL..... 77

Tabela 24 Análise de variância para a atividade de PMGL do planejamento fatorial 2^2..... 78

Tabela 25 Atividade de PMGL (U/mL) em função da concentração de pectina cítrica..... 80

Tabela 26 Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática da pectina liase em função de temperatura e pH ótimos..... 84

Tabela 27 Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de pectina liase em função de temperatura e pH ótimos..... 85

Tabela 28 Análise de variância para a atividade de PMGL do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos..... 85
Tabela 29 Influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL..... 87
Tabela 30 Influência dos pHs na estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL..... 88
Tabela 31 Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resposta em produção de Pectinametilesterase e pH..... 89
Tabela 32 Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2^2 para atividade de PME..... 90
Tabela 33 Análise de variância para a atividade de PME do planejamento fatorial 2^2..... 90
Tabela 34 Atividade da PME em diferentes concentrações dos sais NaCl, $CaCl_2$, e a mistura NaCl/$CaCl_2$..... 94
Tabela 35 Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática de pectinametilesterase em função de temperatura e pH..... 96
Tabela 36 Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de PME em função de temperatura e pH..... 97
Tabela 37 Análise de variância para a atividade de PME do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH..... 97
Tabela 38 Influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático bruto da PME..... 99
Tabela 39 Influência dos pHs na estabilidade do extrato enzimático bruto da PME..... 100
Tabela 40 Redução de viscosidade do suco de pêssego após o tratamento enzimático..... 102
Tabela 41 Redução de turbidez do suco de pêssego após o tratamento enzimático.. 102
Tabela 42 Clarificação do suco de pêssego após o tratamento enzimático..... 103
Tabela 43 Valores de pH e sólidos solúveis (°Brix) do suco de pêssego após o tratamento enzimático..... 103

Tabela 44 Atividade da exo- PG (μmol/mL/min) durante as 96 horas de fermentação para os 108 micro-organismos testados..... 127

Tabela 45 Estudo cinético da produção de pectina liase (PMGL) em todos os ensaios do planejamento do tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH..... 130

Tabela 46 Estudo cinético da produção de pectinametilesterase (PME) em todos os ensaios do planejamento do tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH..... 131

Tabela 47 Estudo cinético da produção de pectinesterase (PE) em todos os ensaios do planejamento do tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH..... 132

Tabela 48 Estudo cinético da produção de pectato liase (PGL) em todos os ensaios do planejamento do tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH..... 133

Tabela 49 Monitoramento do pH em todos os ensaios do planejamento experimental fatorial completo 2^2 da produção de exo-PG em biorreator..... 134

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

PG	Poligalacturonase	R^2	Coeficiente de correlação
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalisílico	β	Beta
rpm	Rotação por minutos	tab	Tabelado
°C	Graus Celsius	pH	Potencial hidrogeniônico
PDA	Potato dextrose Agar	M	Molaridade
DNA	Ácido desoxirribonucleico	F tab	Valor tabelado de F
rDNA	DNA recombinante	FES	Fermentação em estado sólido
mM	Mili-molar	FS	Fermentação submersa
µL	Micro-litros	vvm	Volume de ar por volume de líquido por minuto
SSF	Fermentação sólida		
s	Segundos	PPases	Protopectinases
v/v	Volume/volume	PE	Pectinesterases
mL	Mililitros	PMGL	Pectina liase
COT	Carbono Orgânico Total	Endo-PMGL	Endo-polimetilgalacturonato liases
SmF	Fermentação Submersa		
U/mL	Unidade/mililitros	Exo-PMGL	Exo-polimetilgalacturonato liases
m/v	Massa/volume		
g/L	Gramas/litros	PGL	Pectato liase/poligalacturonato liases
α	Alfa	Exo-PG	Exo-poligalacturonases
min	Minutos	Endo-PG	Endo-poligalacturonases
UA	Unidade de atividade	PME	Pectinametilesterase
%	Porcentagem	RAPD	*Random Amplified Polymorphic DNA*

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos avança gradativamente na inclusão de processos biotecnológicos em suas linhas de produção. Com isso, o desenvolvimento e aprimoramento de processos enzimáticos em substituição a processos químicos convencionais têm adquirido bastante importância no setor. Esse fato se deve principalmente, à especificidade, potencial catalítico das enzimas e ao interesse gerado por processos que envolvam tecnologia de baixo custo energético, menor impacto ambiental e que utilizem matérias-primas renováveis (Carvalho, 2007).

Um grupo de enzimas com grande potencial a oferecer à indústria de alimentos é o das pectinases, pois estas degradam as substâncias pécticas, importantes componentes estruturais da parede celular e da lamela média dos vegetais. Essas hidrolases estão naturalmente presentes nos tecidos vegetais e, portanto, têm a capacidade de causar mudanças na textura das frutas e hortaliças ou, ainda, tornar-se um importante agente desestabilizador em sucos, provocando a sua turbidez (Resende *et al.,* 2004).

As pectinases possuem inúmeras aplicações na indústria de alimentos tais como a redução da viscosidade da polpa de fruta (melhorando por sua vez, a extração, a filtração e a clarificação de sucos), acelerando e inibindo a formação de espuma nas fermentações de chá e café, auxiliando na extração de óleo vegetal, mantendo a textura de pedaços de frutas para posterior adição em outros produtos (Resende *et al.,* 2004; Oliveira, 2005).

Por consequência, as pectinases respondem por 25% nas vendas globais de enzimas utilizadas em processamento de alimentos, mas o Brasil, apesar de ter enorme potencial de produção, ainda é basicamente um consumidor desses produtos importados, tornando-se necessário, o estudo avançado dessas enzimas, analisando novas fontes de extração economicamente viáveis, propriedades e condições ótimas de atuação (Jayani, 2005).

A maior parte dos micro-organismos pectinolíticos produz um complexo de enzimas pectinolíticas. Fungos são geralmente usados como fonte das preparações comerciais (Fawole & Odunfa, 2003). Na maioria dos casos o fungo *Aspergillus niger* é utilizado para produção industrial, já que é classificado como GRAS (generally recognized as safe) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão do governo dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e medicamentos. Entretanto, as pesquisas com o gênero *Penicillium* sp. tem demonstrado que alguns isolados são

produtores promissores de pectinases (Baracat *et al.,*1989; Fernandes-Salomão *et al.,* 1996).

A produção de pectinases por micro-organismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e temperatura do cultivo, além de outros fatores (Bravo *et al.,* 2000).

Face ao exposto, tornam-se necessários o desenvolvimento de estudos de *screening* de micro-organismos produtores de pectinases, no sentido de isolar e selecionar cepas de interesse específico, bem como técnicas de seleção, isolamento e manutenção destes micro-organismos, assim como também estudos em produção de pectinases no sentido de aumentar o rendimento e baixar custos.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral produzir e caracterizar parcialmente as pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa. Para atingir este objetivo foram realizadas as seguintes etapas caracterizando-se como objetivos específicos:

- *Screening* de micro-organismos com potencial de produção de pectinases;
- Identificar o micro-organismo de maior potencial pectinolítico;
- Produção das pectinases (exo-poligalacturonase, pectato liase, pectina liase, pectinametilesterase e pectinesterase) em fermentação submersa pelo micro-organismo *Penicillium brasilianum*;
- Avaliar o perfil cinético de produção das pectinases (exo-poligalacturonase, pectina liase e pectinametilesterase);
- Caracterizar parcialmente as enzimas pectinolíticas produzidas pelo micro-organismo *Penicillium brasilianum*;
- Avaliar o potencial de aplicação das pectinases produzidas pelo micro-organismo *Penicillium brasilianum* em suco de pêssego.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão apresentadas informações sobre substâncias pécticas que são degradadas pelas enzimas pectinolíticas, uma breve abordagem sobre os aspectos de produção destas enzimas por micro-organismos; classificação, mecanismo de ação e caracterização enzimática; além do relato de algumas aplicações de importância industrial.

2.1. Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores. Quimicamente são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α (1→4), parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (Uenojo & Pastore, 2007).

Baseado nos tipos de modificações da cadeia principal, as substâncias pécticas são classificadas em (Martins, 2006):

1- Protopectina: é o termo usado para descrever as substâncias pécticas insolúveis em água, das quais se originam as substâncias pécticas solúveis;

2- Ácido péctico: são os ácidos poligalacturônicos cujos grupos carboxílicos não se apresentam esterificados com grupos metila;

3- Ácido pectínico: são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos. Estes compostos apresentam a propriedade de formar gel na presença de açúcares e cátions divalentes;

4- Pectina: é o nome genérico de misturas pécticas que contêm ácido pectínico como maior componente.

Além da função adesiva que exercem nas paredes celulares das plantas superiores, estas também são responsáveis pelas diferenças de textura das frutas e dos vegetais durante o seu crescimento, amadurecimento e armazenamento. A pectina tem sido indicada ainda como importante fator de interação entre plantas e seus patógenos (Martins, 2006). Estudos têm mostrado que a degradação da pectina difere significativamente entre os diversos tipos de frutos, ainda que os níveis da atividade das pectinases sejam similares (Huber *et al*., 2001). As enzimas pécticas são produzidas por vegetais como cenoura, pêssego, frutas cítricas, pepino, pêra e maçã, no trato intestinal

de diversos insetos, nas células de fungos filamentosos, leveduras e em certas bactérias. (Vries *et al*., 2000).

O grau de esterificação e de polimerização, a proporção de açúcares neutros, o peso molecular, são os principais fatores de heterogeneidade entre as substâncias pécticas de diferentes origens. Isso torna improvável a existência de pectinas idênticas. A pectólise, ação das enzimas pectinolíticas, é um fenômeno associado com vários processos biológicos da planta, tais como alongamento, crescimento celular e maturação do fruto (Couri, 1993).

2.2. Enzimas pectinolíticas: classificação e mecanismos de ação

As pectinases despolimerizam a pectina por hidrólise e transeliminação, bem como por reações de desesterificação, isto é, hidrolisam a cadeia éster entre os grupos carboxila e metil da pectina (Dartora *et al*., 2002).

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 transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica - enzima endo ou terminal - exo (Uenojo, 2003). Existem basicamente três tipos de pectinases: 1) protopectinases que hidrolisam a protopectina insolúvel originando pectina solúvel; 2) pectinesterases que catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxílicos; e 3) despolimerizantes que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α (1,4) das cadeias glicosídicas no ácido D – galacturônico (Jayani *et al*., 2005).

1) Protopectinases (PPases): também conhecidas por pectinosinases catalisam a hidrólise da protopectina, originando ácido péctico e pectina, diminuindo a rigidez da parede celular durante o amolecimento e o amadurecimento dos vegetais. Existem dois tipos de PPases, o tipo A faz a clivagem na parte interna da molécula do ácido poligalacturônico da protopectina, enquanto o tipo B nas cadeias de polissacarídeos que podem estar conectados à cadeia de ácido poligalacturônico e constituintes da parede celular (Jayani *et al*., 2005).

2) Pectinesterases (PE) (E.C. 3.1.1.1): também denominadas de polimetilgalacturonato esterase (PMGE). 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) (Alkorta *et al*., 1998; Gava, 1998).

A desesterificação da pectina ocorre linearmente ao longo da molécula, por mecanismo em cadeia simples, comumente reduzindo a esterificação em 10% (Gava, 1998). Durante a reação ocorre a quebra da molécula da água e a adição de um hidrogênio a um carbono da ligação e adição do grupo hidroxila a outro carbono, produzindo metano e pectina com baixo grau de metoxilação. 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 (Tribess, 2003).

As pectinesterases são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras e plantas 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). São reconhecidas várias isoformas de PE, que variam em termorresistência e em número de acordo com a fonte vegetal. Em suco de laranja existem pelo menos sete isoformas, com pesos moleculares, resistência térmica e atividades diferentes (Tribess, 2003). A Figura 1 demonstra o modo de ação da pectinesterase.

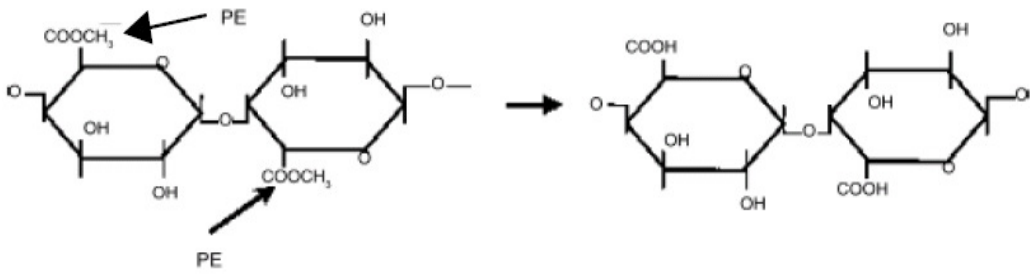


Figura 1 - Modo de ação da pectinesterase. A seta indica o local de reação da enzima na substância péctica (Jayani *et al.,* 2005).

3) Despolimerases*:* catalisam a quebra das ligações glicosídicas α (1→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 em liases e hidrolases:

a) 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). Esse grupo é constituído pela pectina liase e pectato liase.

Pectina Liase (PMGL)

A pectina liase (PL) (E.C. 4.2.2.10), também chamada de polimetilgalacturonato liase (PMGL) e/ou transeliminase, é uma enzima que atua na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de transeliminação de hidrogênio, onde clivam as ligações glicosídicas no carbono 4 e simultaneamente eliminam hidrogênio do carbono 5 (Figura 2). Estas enzimas são subdivididas em dois tipos, as endopolimetilgalacturonato liases [Endo-PMGL] que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações α (1→4) da pectina e as exopolimetilgalacturonato liases [Exo-PMGL], que catalisam a ruptura das ligações α (1→4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora. Atuam preferencialmente no ácido pectínolico (Martins, 2006; Jayani *et al*., 2005, Yadav *et al.,* 2009).

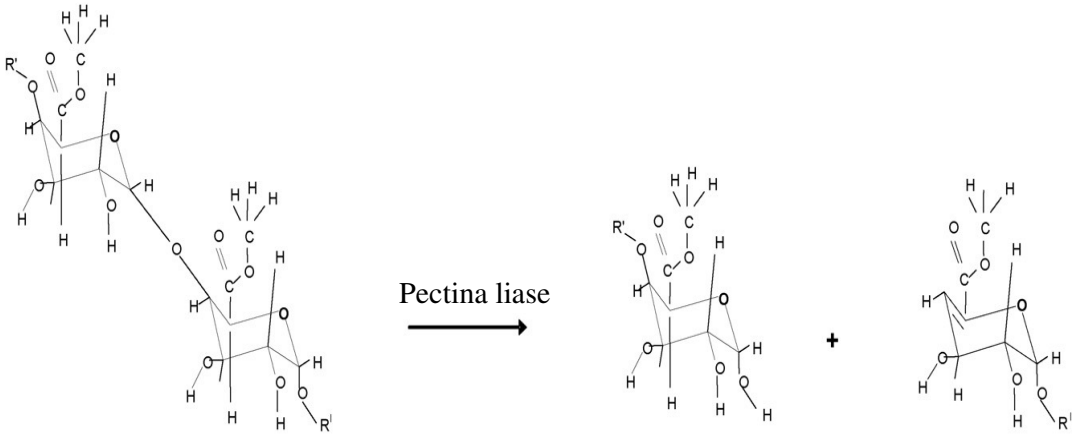


Figura 2 - Modo de ação da pectina liase na substância péctica (Yadav *et al.,* 2009).

Pectato Liase (PGL)

A pectato liase (poligalacturonato liases, PGL) é uma liase que têm preferência por ácido péctico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação) (Martins, 2006). A PGL cataliza a separação da ligação glicosídica α – 1,4 do ácido péctico por trans-eliminação e é dividida em endo – PGL (E.C. 4.2.2.2), que cataliza a clivagem aleatória da ligação glicosídica α (1→4) do ácido péctico e exo-PGL (E.C. 4.2.2.9), que cataliza a clivagem sequencial da ligação glicosídica α (1→4) do ácido péctico na extremidade da cadeia (Correia, 2010).

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

Poligalacturonases (PG)

As poligalacturonases (PG) são enzimas que catalisam a hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico de que é constituída a pectina. Como a poligalacturonase é mais ativa na degradação de pectinas desmetiladas, a ação da pectinametilesterase prepara, ou seja, torna a pectina acessível à degradação realizada por essa enzima, causando sua despolimerização (Carvalho *et al*., 2001; Assis *et al*., 2004; Lohani *et al.,* 2004; Jayani *et al.,* 2005).

A quebra das ligações glicosídicas existentes nas substâncias pécticas está diretamente ligada ao aumento de pectinas solúveis, à diminuição da rigidez intercelular e a adesividade dos tecidos vegetais (Carvalho, 2007).

A maioria das poligalacturonases pesquisadas reage eficazmente em pH ácido variando de 3,5 a 5,5. Embora a temperatura ótima citada na maioria dos trabalhos esteja entre 30-50°C, algumas poligalacturonases que catalisam a hidrólise de substâncias pécticas a temperaturas mais altas também têm sido isoladas (Carvalho, 2007).

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 (Benen & Visser, 2003; Resende *et al.,* 2004). As poligalacturonases podem proporcionar a clivagem dessa cadeia de diferentes formas (Figura 3). As exo-poligalacturonases [Exo-PG (E.C. 3.2.1.67)] 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 [Endo-PG (E.C.3.2.1.15)] podem catalisar o rompimento aleatório dessa ligação (Carvalho, 2007).

As poligalacturonases necessitam de grupos carboxílicos livres para a catálise. A presença de grupos metoxílicos na molécula da pectina pode inibir a atividade dessas enzimas (Dinu, 2001). Endo-PG proporciona a produção de uma série de oligogalacturonatos e pouca quantidade de mono e digalacturonatos, enquanto que Exo-PG produz relativamente alta concentração de mono e/ou digalacturonatos (Whitaker, 1990).

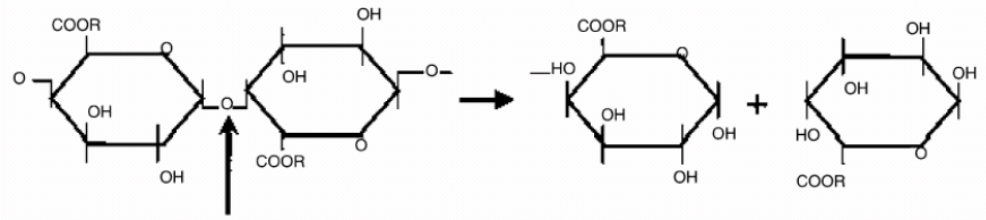


Figura 3 – Modo de ação da poligalacturonase. A seta indica o local de reação da enzima na substância péctica (Sathyanarayana & Panda, 2003).

Pectinametilesterase (PME)

A pectinametilesterase (PME) (E.C.3.1.1.11) também conhecida por polimetilgalacturonato (PMG) catalisa a remoção dos grupos metil, atuando nos finais redutores e no interior das cadeias pécticas com alto grau de esterificação (reduzindo seu peso), por consequência, sua atividade é mais alta quando de 65-75 % da pectina está metilada (Whitaker, 1984; Cosgrove, 1997; Evangelista, Chitarra & Chitarra, 2000).

A maioria das PME's tem pesos moleculares de 35 a 50 kDa. Estima-se também que os valores de pH e temperatura ótima nos quais essas enzimas são ativas estão entre valores de 4-8 e 40-50°C, respectivamente (Assis *et al.,* 2004).

Em sucos, a diminuição no grau de esterificação e o aumento na densidade de cargas geradas na cadeia péctica causam uma elevação na afinidade pelos íons de cálcio (Ca^{+}), sendo então geradas ligações cruzadas intermoleculares mediadas por esse íon. Esta auto-associação das regiões não esterificadas da pectina poderá levar à formação de agregados e por consequência sua precipitação (Rombouts *et al.,* 1982; Baker & Cameron, 1999; Boas *et al.,* 2000). A pectinametilesterase pode também estar envolvida no processo de alongação preliminar de paredes durante o crescimento da célula (Assis, Lima & Oliveira, 2001).

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 (Figura 4) (Wong, 1995; Pimenta, Chagas & Costa, 2000; Voragen, Belman & Schols, 2001).

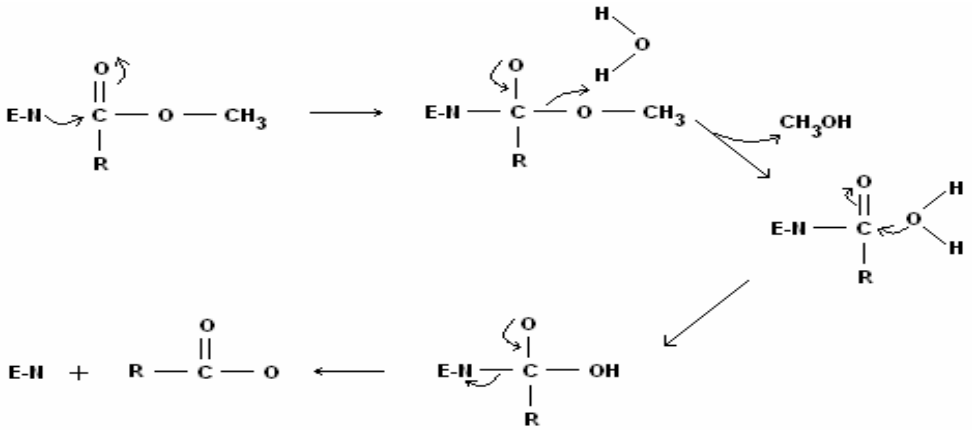


Figura 4 - Mecanismo de reação da pectinametilesterase sobre a pectina (Wong, 1995).

Na Figura 5, é possível observar como as enzimas pectinolíticas atuam sobre uma molécula de pectina, conforme a classificação anteriormente mencionada.

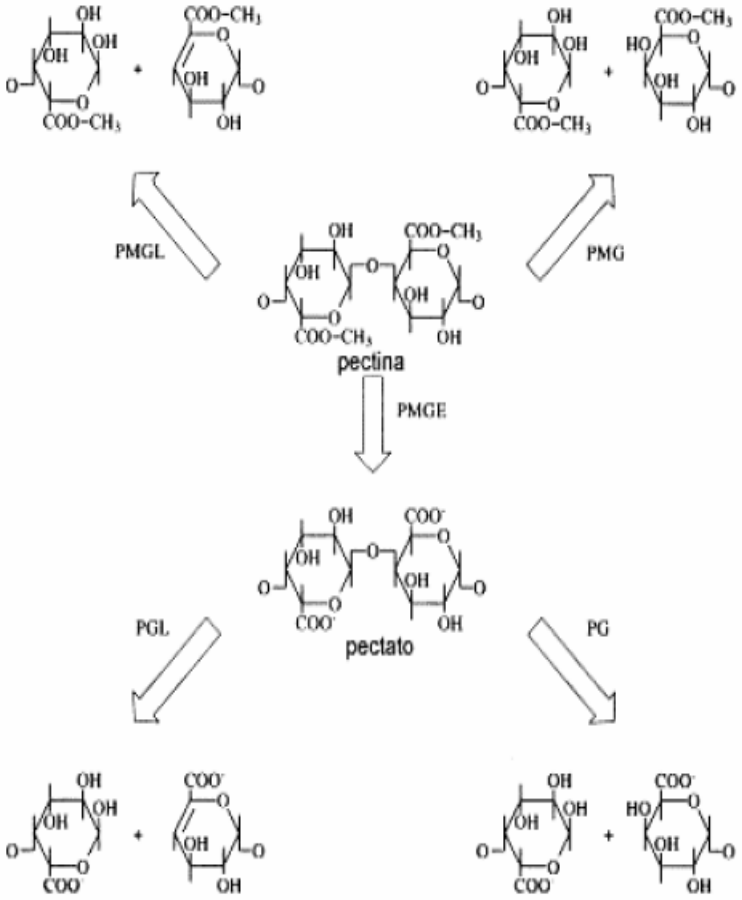


Figura 5 – Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina (Alkorta, 1998).

2.3. Produção de pectinases

A Tabela 1 apresenta uma relação de micro-organismos produtores de enzimas pectinolíticas, destacando quais enzimas são produzidas por gênero microbiano. Dos micro-organismos citados na referida Tabela, as preparações de pectinases mais comumente utilizadas são de origem fúngica, principalmente de *Penicillium* e *Aspergillus* (Santos, 2007). Segundo Santi (2005) destacam-se os fungos do gênero *Penicillium* como o *Penicillium italicum, Penicillium digitatum, Penicillium griseoroseum* e o *Penicillium oxalicum* pelas características e quantidade de enzima secretada.

Tabela 1 – Ocorrência e principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas.

Enzima Pectinolítica	Principais Agentes Produtores
Protopectinase tipo A	*Kluyveromyces fragilis*, *Galactomyces reesei*, *Trichosporon fragilis*
Protopectinase tipo B	*Trametes* sp.
Endo-poligalacturonase	*Aureobasidium pullulans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *A. niger*, *Thermomyces lanuginosus*, *Peacilomyces clavisporus*
Exo-poligalacturonase	*Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *E. chrysanthemi*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus* sp.
Pectato liases	*Colletotrichum lindemuthionum*, *B. thetaiotaomicron*, *E. carotovora*, *Amucala* sp., *Pseudomonas syringae*, *C. magna*, *E. chrysanthemi*, *Bacillus* sp., *C. gloeosporioides*
Pectina liases	*Aspergillus* sp., *A. japonicus*, *Penicillium* sp., *P. paxilli*, *Pythium splendens*, *Pichia pinus*, *Thermoascus aratniacus, A. sojae, Erwinia aroideae, A. oryzae, Fusarium oxysporum, Bacillus* sp. PN 33, *Paenibacillus amylolyticus, Thermoascus aurantiacus, A. niger, Cystofilobasidium capitatum, P. canescens, P. expansum, P. italicum, P. oxalicum, P. viridicatum, A. ficuum, A. flavus.*
Pectinesterases	*Rhodotorula* sp., *Phytophthora infestans*, *E. chrysanthemi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachnospira pectinoschiza*, *P. solanacearum*, *A. niger*, *Lactobacillus lactis*, *P. frequentans*, *A. japonicus, P. occidentanis*

Fonte: Jayani *et al*. (2005), Yadav *et al.* (2009).

Segundo Fill (2009), *Penicillium* é um gênero de fungos que cresce em matéria orgânica morta, como queijos, cereais ou frutas. Dentre estes se encontra o *Penicillium brasilianum* (identificação taxonômica 104259), uma espécie de fungo com capacidade

de produção de monoterpenos, amidas e enzimas de importância biotecnológica, como a produção de enzimas pectinolíticas. De acordo com Fontana *et al.* (2009), meios de cultura com um equilíbrio adequado de açúcares simples e pectina apresentam melhores resultados na produção de enzimas pectinolíticas no processo de fermentação submersa.

A grande maioria dos estudos realizados na produção de pectinases são em fermentação semi-sólida, mas empregando meio submerso ocorre aumento na bioprodução destas enzimas e é possível um maior controle do processo fermentativo (Fontana *et al.*, 2009).

Nos processos submersos 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 (biorreatores) 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 (Malajovich, 2004). Os biorreatores com agitação mecânica são os mais empregados nos processos submersos e no aumento de escala de produção, sendo que estes se caracterizam pela presença de agitadores e chicanas que são indispensáveis para promover a transferência de calor e de massa e a manutenção da homogeneidade do sistema. A agitação mecânica permite eficiência na mistura das substâncias, ruptura de bolhas de ar e dispersão de agregados celulares (Schmidell & Facciotti, 2001). Conforme Lee (1992), o biorreator de mistura pode ser empregado para cultivos aeróbios e anaeróbios de grande escala, com micro-organismos, células animais e vegetais. A intensidade da mistura pode ser modificada pela escolha de adequados tipos de turbinas e por variadas velocidades de agitação. Podem ser, também, usados para meios com viscosidade elevada.

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.

Friedrich *et al.* (1994), em cultivo de *A. niger* para a produção de enzimas pectinolíticas e ácido cítrico em biorreator, observaram que na fase do cultivo em que ocorre pronunciado crescimento celular e, consequentemente, aumento do consumo de oxigênio dissolvido, a aeração deve ser mantida em nível que garanta uma percentagem mínima de oxigênio em solução para manter a viabilidade do micro-organismo.

A Tabela 2 apresenta uma revisão dos micro-organismos produtores de pectinases (PG, PE, PMGL – Endo e Exo), destacando o substrato utilizado para a produção, a atividade obtida e o processo fermentativo submerso eu sólido (SmF ou SSF) com as respectivas referências. Por exemplo, Gomes *et al.* (2010), produziram exo-PG pelo micro-organismo *A. niger* ATCC 9642 em fermentação submersa usando pectina cítrica como substrato e obtiveram atividade máxima de 51,82 U/mL. Panarotto *et al.* (2003) utilizando como fonte de pectina cascas de limão Taiti na produção da enzima poligalacturonase (PG) e como substrato farelo de trigo, verificaram que o pico de atividade foi alcançado quando 80 % de cascas secas de limão Taiti foram utilizadas como fonte de indutor, chegando em 72 horas de fermentação a 43 e 80 U/g de meio sólido para a endo e exo-PG, respectivamente. 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. Fontana *et al.* (2005), estudando o efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonase por *Arpergillus niger* em meio sólido, constaram que a adição de pectina cítrica em meio sólido a base de farelo de trigo, até o limite de 16 % (m/m), afetou positivamente o crescimento de *A. niger*, reprimindo, entretanto, a formação de exo-PG. Por outro lado, demonstraram que o efeito repressivo do indutor pode ser reduzido utilizando-se uma mistura de 6 % (m/m) de pectina cítrica e 10 % (m/m) de glicose no meio. Botella *et al.* (2007) observaram o efeito da umidade inicial 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, a produção de ambas as enzimas aumentou significativamente, mas com glicose na concentração de 8 % a atividade enzimática diminuiu. A máxima produção foi de aproximadamente 40 U/mL em 48 horas de cultivo. Martins *et al.* (2007) trabalharam com fermentação semi-sólida avaliando qual o melhor substrato para produção de PG *Rhizomucor* sp N31. Utilizando uma mistura de farelo de trigo (50 %) e bagaço de cana-de-açúcar (50 %) obtiveram 110 U/g em 48 horas de fermentação.

Tabela 2 – Produção de pectinases por diferentes cepas microbianas.

Enzima	Substrato	Micro-organismos	Atividade enzimática	SSF/ SmF	Referência
PE	Casca de maçã	*A. niger*	14,0 U/mL	SSF	Trindade *et al*., 1996
PG	Polpa de morango	*Lentinus edodes*	29,4 U/g	SSF	Zheng & Shetty, 2000
	Polpa de maçã		20,1 U/g	SSF	
	Polpa de framboesa		14,0 U/g	SSF	
Endo-PG	Farelo de trigo e cascas de limão Taiti como indutor	*A. niger* T0005007-2	43,0 U/g	SSF	Panarotto *et al.,* 2003
Exo-PG			80,0 U/g	SSF	
Exo-PG	Pectina cítrica	*A. niger*	3,0 U/mL	SmF	Galiotou-Panayotou *et al.,* 1997
Exo-PG	Pectina sintética	*A. niger*	33,0 U/g	SSF	Solís & Pereira *et al.,* 1993
Endo-PG	Farelo de trigo	*Bacillus* sp.	2,0 U/ml	SSF	Soares *et al.,* 2001
Endo-PG	Pectina a 1,0% e glicerol a 0,2%	*A. japonicus*	0,59 U/ml		Teixeira *et al.,* 2000
PG	Bagaço de laranja	*P. viridicatum* RFC3	12 U/g		Silva *et al.,* 2002
	Casca de manga		12 U/g		
	Casca de banana		7,5 U/g		
PG	Casca de maracujá	*A. niger* CNPAT 001	21,85 U/g		Pinto *et al.,* 2006
PG	Morango	*Lentinus edodes*	29,4 U/g		Zheng & Shetty, 2000
	Maçã		20,1 U/g		
PG	Pectina cítrica	*Bacillus*	3,5 U/mL	SmF	Soares, 1999
	1% (NH4)2SO4 e 0.02% MgSO4		0,8 U/mL	SSF	
PMGL	$CaCl_2$ (0,05%)	*Bacillus* sp.	54,7 U/mL	SmF	Kashyap *et al.,* 2000
PG	Pedúnculo do caju	*A. niger* mutante CCT 0916	16,0 U/g		Santos, 2007

Tabela 2 - Continuação.

Enzima	Substrato	Micro-organismos	Atividade enzimática	SSF/ SmF	Referência
PG	Bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo	*Moniellla* sp.	18,740 U/g	SSF	Martins *et al.,* 2004
PMGL			34 U/g	SSF	
PG	Bagaço de laranja	*Thermoascus aurantiacus*	46 U/g	SSF	Martins *et al.,* 2002
PMGL	10% bagaço de cana + 90% de bagaço de laranja		40,180 U/g	SSF	
Endo-PG	Pectina cítrica	*A. Awamori*	0,07 U/mL	SmF	Blandino *et al.,* 2002
Exo-PG		*Rhizopus*	0,04 U/mL	SmF	
PG	33,25% resíduo de maracujá + 66,75% farelo de trigo	*A. niger* mutante 3T5B8	12,01 U/mL	SSF	Menezes *et al.,* 2006
PE			1,54 U/g		
Exo-PG	Pectina cítrica	*P. viridicatum* RFC 3	18 U/mL	SSF	Silva *et al.,* 2007
Exo-PG	10% de ácido galacturônico	*Aspergillus* sp.	27 U/g_m	SSF	Solis & Pereira *et al.,* 1993
	10% de sacarose		17 U/g_m		
	10% de glicose		35 U/g_m		
Endo-PMGL	6% sucrose		18,9 U/mL	SmF	Patil *et al.,* 2006
Exo-PMGL			30,3 U/mL		
Endo-PMGL	4% glucose		19,8 U/g	SSF	
Exo-PMGL			45,9 U/g		

Tabela 2 - Continuação.

Enzima	Substrato	Micro-organismos	Atividade enzimática	SSF/ SmF	Referência
PG	Farelo de trigo e bagaço de cana-deaçúcar	*Rhizomucor* sp. N31	110,0 U/g		Martins *et al.,* 2007
Exo-PG	Polpa de uva	*A. awamori*	38,0 U/g		Botella *et al.,* 2007
PG	Farelo de trigo	*A. niger* 3T5B8	33,0 U/mL		Terzi *et al.,* 2003
Endo-PG	Farelo de trigo	*A. niger* T0005007-2	140,0 U/g		Fontana *et al.,* 2005
Exo-PG			370,0 U/g		
PG	Farelo de trigo / bagaço de cana /bagaço de laranja	*Monascus* sp.	6,6 U/mL	SSF	Martins *et al.,* 2006
PG	Farelo de trigo / bagaço de laranja	*Aspergillus* sp.	10 U/mL		
PG	Pectina de maça	*Bacillus* sp.	42 U/mL	SmF	Cordeiro *et al.,* 2009
PG	Farelo de trigo e farelo desengordurado de arroz	*Aspergillus* sp.	1800 U/g	SmF	Linde *et al.,* 2007
PG	Resíduo do pedúnculo de caju	*A. niger CCT 0916*	10,4 U/g	SSF	Santos *et al.,* 2008
PG	Cascas de manga	*A. niger* M21 mutante	3,35 U/mL		Couri *et al.,* 2000
PG	Farelo de trigo e bagaço de laranja	*P. viridicatum* RFC3	8,9 U/mL		Silva *et al.,* 2005
Exo-PG	Pectina cítrica	*A. niger* ATCC 9642	51,82 U/mL	SmF	Gomes *et al.,* 2010

2.4. *Screening* de micro-organismos produtores de pectinases

As pectinases podem ser produzidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos varia entre as espécies de micro-organismos, portanto a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para o uso industrial (El-refai *et al*., 1984; Ueda *et al*., 1982; de Conti *et al*., 2001).

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico. Além disso, as pectinases produzidas por fungos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos, como estabilidade ao pH e à temperatura (Martins *et al.,* 2004). Um outro fator que pode justificar a crescente utilização de enzimas fúngicas na indústria de alimentos é o fato dos fungos produtores de pectinases possuírem o pH de atuação bem próximo ao pH da maioria dos sucos de frutas, o qual varia de 3,0 a 5,5 (Moyo *et al*., 2003).

Preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngicas, especialmente de *Aspergillus* e *Penicillium,* que exibem características de alta atividade de endo-poligalacturonase e de pectina liase. Estas preparações de pectinases disponíveis no mercado são compostas por pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina liase. Além do gênero *Aspergillus* e *Penicillium,* outros fungos filamentosos produtores de pectinases são citados por Geocze (1994) e Castilho (1999), como: *Fusariim, Sclerolinia, Monilia, Coniolhyrium e Rhizopus* dentre vários outros que vêm sendo avaliados como potentes produtores de pectinases. Apesar da propriedade desses fungos quanto a produção de pectinases, nem todos são aproveitáveis, já que alguns deles são produtores de várias micotoxinas, que podem ser prejudiciais à saúde do homem (Dalboge, 1999)

Apesar de existirem vários fungos produtores de pectinases, Jia *et al.* (2000), afirmam que as enzimas pectinolíticas usadas na indústria de alimentos são comercialmente produzidas em sua maioria por *A. niger*. Esta espécie de fungo produz várias pectinases, incluindo pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PMGL). As pectinases produzidas por *A. niger* são de grande importância, pois são classificadas como GRAS (Generally Recognized As Safe), permitindo assim sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos. Além disso, a pectina liase produzida por *A. niger* é a única enzima capaz de hidrolisar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, como a pectina de frutas. O *screening* de micro-organismos produtores de enzimas é importante para o desenvolvimento de enzimas e semi-purificação de processos futuros, podendo ser usado para biocatálises e sínteses orgânicas (Cardernas *et al.*, 2001). Martins *et al.* (2004) estudaram a produção de pectina liase e poligalacturonase por linhagens de fungos filamentosos isoladas, através de fermentação em estado sólido, utilizando subprodutos agro-industriais. As poligalacturonases de *Moniliella* sp. mostraram atividade máxima em pH 4,5 e pH da

pectina liase em 10,0, enquanto o pH de poligalacturonase de *Penicillium* sp EGC5 apresentou pH ótimo em 4.5-5.0 e 9,0, respectivamente.

Molina (2001) estudou 18 linhagens de fungos filamentosos, com o objetivo de obter enzimas para a decruagem das fibras de matéria têxtil. As linhagens foram avaliadas para a produção de enzimas pectinolíticas sob diversas circunstâncias de crescimento (meio de cultura e temperatura do crescimento). A produção de pectinases foi medida por índice enzimático no meio de pectina. Entre as linhagens testadas, o *P. chrysogenum* IFO 4626 (Q 176) mostrou o melhor desempenho. Soares *et al.* (1999), isolaram, a partir de amostras de solo e de material vegetal em decomposição, 168 linhagens bacterianas capazes de utilizar pectina de citrus como única fonte de carbono. Destas, 102 foram positivas para a despolimerização da pectina, através de ensaios em placa de Petri, nos quais foram detectados halos claros ao redor das colônias. Entre essas, 30 % foram consideradas ótimas ou boas produtoras de poligalacturonases. O cultivo dessas linhagens através de fermentação submersa e semisólida para a quantificação das poligalacturonases (PG) produzidas indicou que 6 linhagens de *Bacillus* sp. foram as melhores produtoras da enzima (0,3 a 4,0 U/mL). As características físico-químicas, como pH ótimos entre 6,0 e 7,0 e temperaturas ótimas entre 45 e 55ºC, estabilidade à temperaturas acima de 40ºC e pH neutros e alcalinos foram determinadas. Uenojo & Pastore (2007) testaram 104 linhagens de micro-organismos, sendo 18 linhagens selecionadas para fermentar em meio líquido, contendo pectina para a determinação de atividade de poligalacturonase (PG), destas 18 linhagens, somente 7 apresentaram unidades de atividade de PG superiores a 80 μmol de ácido galacturônico/mL/min.

2.5. Caracterização das enzimas pectinolíticas

A desnaturação de proteínas é uma alteração sensível na estrutura original da proteína, sem que ocorra alteração na sequência dos aminoácidos, isto é, sem que haja rompimento ou alterações de ligações químicas primárias, que ligam aminoácidos entre si (Sgarbieri, 1996; Souza, 2008). 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 estáveis a temperatura de refrigeração, outras na 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 as proteínas mais estáveis só experimentam pela ação combinada do calor e pH baixo (Souza, 2008).

Devido às condições de processamento na indústria, como o emprego de elevadas temperaturas, as enzimas podem se tornar instáveis e 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 das pectinases, realizaram também estudos de estabilidade enzimática. Zheng & Shetty (2000) verificaram o efeito da temperatura e pH na estabilidade da poligalacturonase produzida por *Lentinus edodes* utilizando resíduos de frutas como substrato. 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 (KH_2PO_4) e o micro-organismo *Aspergillus niger* como agente da fermentação.

Martins *et al.* (2005) utilizaram fermentação submersa para caracterizar uma pectinase 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 enzima péctica manteve, cerca de 91 % da atividade original. Em valores de pH elevados houve uma queda na estabilidade. No caso da temperatura, para valores até 50ºC, a enzima conservou 80 % da sua atividade original e manteve apenas 6 % dessa atividade quando exposta a uma temperatura de 70ºC.

2.6. Aplicação industrial das pectinases

O mercado mundial de enzimas apresenta valor comercial de US$ 2 bilhões de dólares anuais e vem crescendo a cada ano com taxas de 8 a 10 %. Deste total, o Brasil participa com 5 % do mercado através de importações chegando a aproximadamente US$ 100 milhões de dólares/ano. A indústria de alimentos é a que mais tem se beneficiado com o uso das enzimas, sendo utilizadas em 15 % dos processos industriais (Santos, 2007). Considerando que 25 % do mercado mundial de enzimas correspondem

às enzimas pectinolíticas, percebe-se uma grande oportunidade de negócio (Aquino, 2007).

As enzimas pectinolíticas consumidas pela indústria brasileira são importadas de alguns laboratórios tais como: Miles, Novo Nordisk, Biocon e Novozymes. O consumo interno é grande e o mercado potencial é muito grande considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de suco de laranja do mundo e significante produtor de vinhos (Santos, 2007), como destacado anteriormente, mercado este potencial para enzimas pectinolíticas. Souza (2008) e Uenojo & Pastore (2007) relataram algumas aplicações industriais importantes das pectinases bem como algumas de suas vantagens as quais são citadas a seguir.

Indústrias de sucos de frutas

As substâncias pécticas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos das frutas, e sua presença causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração. A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50 % o tempo de filtração. A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, é usada na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. A hidrólise enzimática das paredes celulares aumenta o rendimento de extração, a polpa resultante tem baixa viscosidade e a quantidade de resíduos da polpa é reduzida. O uso de enzimas de maceração aumenta o rendimento da extração e melhora o processamento, sem aumento de custos. Essas enzimas são utilizadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta. Após a extração, pectinases são adicionadas para clarificação e diminuição de viscosidade para facilitar a filtração e concentração.

Recuperação de óleos essenciais

Após a extração do suco, as partículas de albedo e a emulsão óleo-água são separadas. Esta emulsão é passada em um ciclone e, a seguir, centrifugada para produzir uma emulsão rica em óleo, que é concentrada. A aplicação de pectinases hidrolisa os

complexos de pectina-proteína, liberando o óleo, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final.

Indústrias de vinhos

As pectinases, em conjunto com D-glucanases e hemicelulases, têm sido utilizadas na produção de vinho. As vantagens do uso das três enzimas são: melhor maceração da casca e aumento da extração de pigmentos, facilita a clarificação e a filtração do mosto e aumenta a qualidade e a estabilidade do vinho. A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco, reduz o tempo de clarificação e aumenta o conteúdo de terpenos no vinho. Preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectinametilesterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho.

Extração de óleos vegetais

A degradação da parede celular por enzimas pectinolíticas permite seu uso para extração de óleo vegetal em processo aquoso, pela liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm óleo. Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulases e hemicelulases começaram a ser utilizadas para extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração. O uso de enzimas de 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 o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade.

Indústria têxtil

Enzimas pectinolíticas podem ser usadas nas indústrias têxteis para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais. Pectinases alcalinas são utilizadas para maceração das fibras vegetais, como linho, cânhamo e juta, na biopreparação de algodão e no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão. Em algodão cru, a remoção da pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com amilases, lipases e hemicelulases em condições adequadas, substituem o uso da soda cáustica e gera produtos de alta

qualidade, para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia.

Indústria de papel e celulose

Durante a fabricação de papel, pectinases podem despolimerizar substâncias pécticas e, subsequentemente, diminuir a demanda catiônica das soluções pécticas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido, solucionar problemas de retenção no branqueamento mecânico da celulose e no tratamento dos efluentes dos moinhos de papel.

Ração animal

Pectinases são utilizadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras.

2.7. Considerações finais

A revisão da literatura apresentada permitiu concluir que as pectinases de origem microbiana apresentam um grande potencial de aplicações biotecnológicas. Até a presente data algumas pectinases produzidas a partir de micro-organismos são escassas, como por exemplo a PME, sendo as frutas e seus derivados as principais fontes destas enzimas que tem sido amplamente utilizadas em diferentes áreas. Ao mesmo tempo, a demanda contínua por enzimas pectinolíticas altamente ativas com propriedades específicas encoraja a pesquisa de pectinases produzidas por micro-organismos.

Sendo assim, é de grande importância a realização de estudos sobre condições apropriadas de produção de pectinases a partir de micro-organismos isolados e pré-selecionados, incluindo o estudo da sua produção. Portanto, o estudo da otimização e/ou maximização da produção de pectinases microbianas a partir de micro-organismos isolados é de grande valia. As características bioquímicas das pectinases, como temperatura de atuação e as faixas de pH, as estabilidades quando submetidas à altas temperaturas ou armazenadas em baixas temperaturas ou temperatura ambiente são de suma importância para determinar suas possíveis aplicações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentadas as metodologias referentes ao isolamento, seleção e identificação dos micro-organismos produtores de pectinases, da bioprodução das pectinases (exo-poligalacturonase, pectina liase, pectinametilesterase, pectato liase e pectinaesterase) em meio complexo, bem como a metodologia para a caracterização parcial e potencial de aplicação das enzimas (exo-PG, PMGL e PME).

3.1. *Screening* de micro-organismos pectinolíticos

Os micro-organismos foram selecionados de amostras de frutas em decomposição (laranja, mamão, kiwi, ameixa preta, pêssego, maçã, melão, goiaba, banana e casca de uva), solo de videiras e de kiwi, folhas de laranjeiras e eucaliptos, produtos processados em decomposição (extrato de tomate, farinhas de trigo e chás). Além dos micro-organismos isolados também foram testadas algumas cepas já identificadas (*Aspergillus niger* e *Pseudomonas putida* proviniente do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Aspergillus niger* ATCC 1004, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Penicillium citrinum* ATCC 28752, *Penicillium notatum* ATCC 9478, *Penicillium camembertii* (CT) ATCC 4845, *Penicillium duclauxii* ATCC 9121, *Paecilomyces variotii* ATCC 22319, *Candida* sp. ATCC 34147 da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Regional Integrada – Campus de Erechim e o *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 proviniente do Centraalbureau Voor Schimmelcultures – Fungal Biodivesrity Centre – Institute of the Royal Netherlands, Academy of arts and Sciences (KNAW).

3.1.1. Isolamento e manutenção dos micro-organismos

As amostras utilizadas para o isolamento dos micro-organismos foram coletadas e inoculadas em placas contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) e incubadas (germinadora– Tecnal TE-401) a 28ºC por 5 a 7 dias. Após o crescimento de diversos micro-organismos em cada placa, estes foram repicados, um a um, para placas com PDA ou PCA (Agar Padrão para Contagem) e incubadas novamente a 28ºC por 5 a 7 dias. Os micro-organismos crescidos foram repicados sucessivamente até isolamento completo dos mesmos.

Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento das culturas de fungos filamentosos em ultra *freezer* a –80ºC (MDF U3086S - Sanyo). O procedimento de congelamento constou das seguintes etapas: repique da cepa, incubação da cultura em meio sólido (para verificação das características morfológicas de leveduras e bactérias) e líquido (específico para fungos filamentosos) e temperatura de 25ºC por 72 horas; adição de agente crioprotetor estéril (glicerol 13 %, p/v); homogeneização (Marconi MA-410) da mistura, sendo a suspensão aliquotada em microtubos estéreis (1,5 mL), devidamente identificados; e congelamento imediato em ultra *freezer* a –80ºC (MDF – U3086S - Sanyo).

Para a conservação de leveduras e bactérias, as cepas foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio PCA com a seguinte composição: 2,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de bacto peptona, 1 g/L de glicose e 20 g/L de ágar e incubados por 48 horas a 25°C. Após este tempo de crescimento, os tubos contendo os micro-organismos foram conservados em óleo mineral a -10°C em refrigerador (Brastemp). A repicagem foi realizada a cada 2 meses. A cultura estoque também foi preservada em óleo mineral e em geladeira 4°C (Consul). Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica (Stanbury *et al*., 2000).

3.1.2. Seleção de micro-organismos produtores de pectinases

A partir dos micro-organismos isolados e das cepas identificadas fez-se um *screening* fermentativo visando a seleção de micro-organismos com potencial de produção de pectinases, especificamente da enzima pectinolítica exo-PG.

O meio de bioprodução utilizado na determinação de atividade exo-poligalacturonássica dos micro-organismos foi proposto inicialmente por Kashyap *et al.* (2000), constituído de 1 % de extrato de levedura, 1 % de pectina cítrica, nas condições de $pH_{inicial}$ de 5,5, a 30°C, 180 rpm por 96 horas. A cada 24 horas de fermentação (*Shaker* – Nova Ética) as culturas foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos a 0°C para separação do sobrenadante livre de células e posterior determinação de atividade pectinolítica. A atividade pectinolítica foi determinada segundo Miller (1956) com metodologia descrita no item 3.5.1 com tempo de reação de 40 minutos.

3.1.3.Identificação dos micro-organismos

Pré-identificação dos micro-organismos e análise de RAPD

Para os micro-organismos de maior potencial pectinolíticos (atividade igual ou superior a 3 U/mL) foi realizada a caracterização dos micro-organismos utilizando meio seletivo para bactérias e leveduras, que foram incubados em placas de Petri a 28°C por 120 horas. O meio seletivo para pré-identificação das bactérias continha para cada 100 mL de PCA com 500 μL de nistatina (100 U/mL), e o meio seletivo para levedura continha para cada 100 mL de PCA 50 μL de cloranfenicol (52,5 mg/mL). O resultado foi verificado com o crescimento ou não da cultura em meio específico.

Os fungos filamentosos foram pré-identificados pela técnica de microcultivo. Os micro-organismos foram inoculados em uma fatia de ágar colocado sobre uma lâmina de vidro esterilizado e coberto por uma lamínula estéril. A lâmina foi colocada em uma placa de Petri, e incubada por cinco dias a 25ºC. A lamela com as hifas aderidas foi retirada e corada com corante azul de algodão (Figura 6). A identificação foi realizada com base na morfologia macroscópica das colônias e no estudo das estruturas de frutificação das cepas, após a chave da investigação de gêneros proposto por Barnett *et al.* (1998).

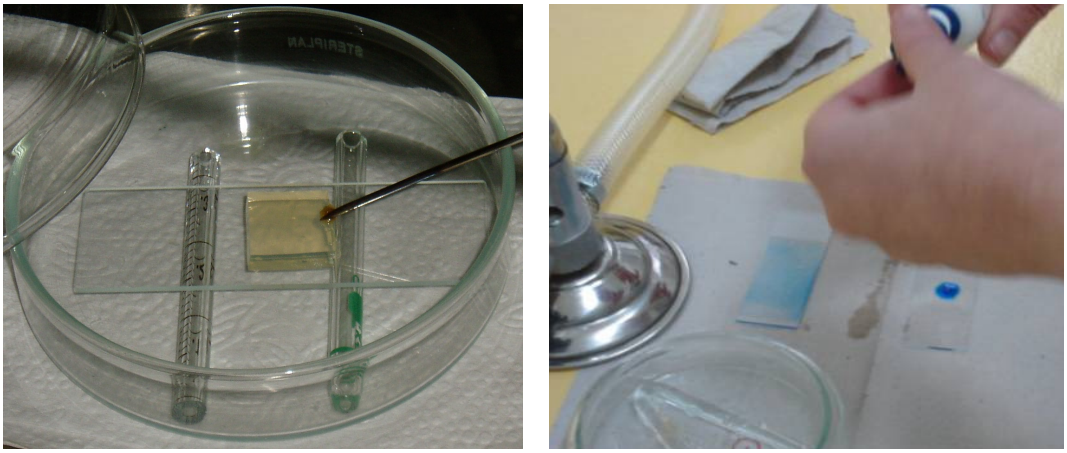


Figura 6 - Preparo da lâmina para identificação dos micro-organismos.

Em seguida foi realizada a diferenciação dos micro-organismos através de técnicas de biologia molecular – RAPD, visando verificar a presença de cepas duplicadas. Inicialmente, realizou-se a extração do DNA e seleção de *primers* através do método de Roeder & Broda (1987). As culturas foram crescidas em meio YM – Yeast Malt. Em seguida, nitrogênio líquido foi adicionado a 300 mg de biomassa em um almofariz, e com um pistilo as células foram maceradas até um pó fino, transferido para

microtubos (Ependorff) e 700 µL de tampão (3 %, v/v) SDS, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 % (v/v) β-mercaptoetanol). Cada amostra foi incubada por 1 hora a 65°C. Na sequência os tubos foram removidos, resfriados e a amostra foi extraída com igual volume de clorofórmio-álcool isoamilíco (24:1, v/v) e centrifugada a 21.467 × g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. Após isto, foram adicionados 120 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 600 µL de isopropanol gelado. O conteúdo foi misturado por inversão, incubado em *freezer* por 30 minutos e centrifugado por 5 minutos a 21.467 ×g. À suspensão foi acrescentado 500 a 700 µL de tampão TE, lavada duas vezes com 500 µL de etanol 70 % e deixado secar. A seguir foi ressuspendida novamente em 200 µL de tampão TE. Para verificar se ocorreu a extração do DNA foi realizada uma corrida com 10 µL de amostra mais 7 µL de TA, em gel de agarose 0,8 %, por 1 hora, em voltagem constante de 90 Volts, em tampão TBE (0,089 M Trisma, 0,089 M ácido bórico e 0,008 M EDTA).

Para a quantificação do DNA adicionando-se 20 µL de amostra em 980 µL de água Mili-Q estéril. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV a 260 nm e confirmação da pureza e integridade em espectrofotômetro (Agilent 8453) UV a 280 nm (proteína) e em gel de agarose 0,8 % (Gibco BRL) em TBE 1 X (0,89 M Tris, 0,89 M de H_3BO_3 e 0,08 M EDTA). Fez-se as diluições visando obter uma concentração final de DNA de 10 ng/µL.

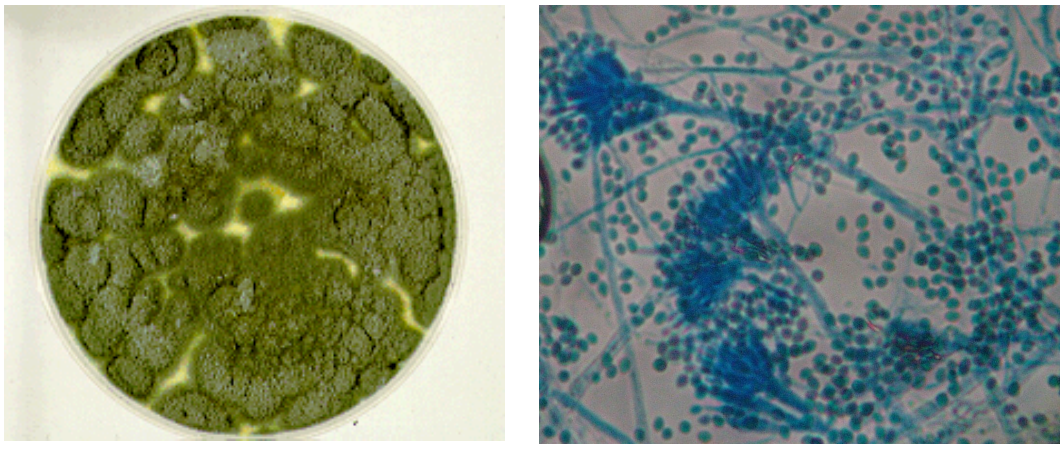
Para a reação de amplificação de RAPD descrita por Williams *et al*. (1990), utiliza-se um volume total de 25 µL: tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl), dNTPs (200 mM de cada), 0,2 mM de *primer*, 3 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de Triton-X-100, 1,5 U (unidades) de Taq DNA *polymerase recombinant* da Invitrogen (*Life Technologies*, São Paulo, Brasil) e aproximadamente 40 ng de DNA (4 µL de amostra). Foram usados kits da OPA, OPF, OPH, OPW e OPY obtidos da Operon Technologies, com 20 *primers* cada um, para identificar os *primers* que mostraram os melhores resultados, tomando-se como base o número, intensidade e tamanho das bandas. A reprodutibilidade e o polimorfismo gerado foram considerados para selecionar os kits. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Rsearch Inc., Watertown, MA (modelo PTC100^{TM} *Programmable Thermal Controller*). O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 minutos a 92ºC, 40 ciclos de 1 minuto a 92ºC, 1 minuto a 35ºC e 2 minutos a 72ºC. Em seguida, 3 minutos a 72ºC e resfriamento a 4ºC até a retirada das amostras.

Após a realização da amplificação do DNA efetuou-se a análise eletroforética dos fragmentos amplificados através da separação eletroforética realizada em gel de agarose 1,4 % em tampão TBE 1X (0,089 M Trisma, 0,089 M ácido bórico e 0,008 M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90 Volts durante 3 horas. A coloração dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (*Media Cybernetics, Silver Spring,* MD).

Em seguida, realizou-se a análise dos dados, onde a determinação da variabilidade genética, pela presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYS versão 1.7 (Rohlf, 1992) (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System*). Os dendrogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*), desenvolvido por Sokal & Michener (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Identificação do micro-organismo Penicillium sp. (*D2)*

Após a análise de RAPD, a qual permitiu verificar tratar-se de micro-organismos distintos, a cepa do fungo filamentoso *Penicillium* sp. (Figura 7), inicialmente codificada como D2, foi selecionada por apresentar a maior atividade em 24 horas de produção de exo-poligalacturonase, quando comparado com os demais micro-organismos isolados e submetidos a identificação.



(a) (b)

Figura 7 – Aspecto visuais do fungo filamentoso *Penicillium* sp.: a) Características da morfologia, b) Microcultivo.

O micro-organismo *Penicillium* sp. foi identificado em parceria com o laboratório CENA da USP de Piracicaba, São Paulo. Para identificação foi utilizado a técnica de biologia molecular, sequenciando as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA fúngico. O produto foi purificado com o Kit GFXTM PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante e seqüenciados em um sequenciador automático (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). Para a construção da sequência, os programas Phred/Phrap e Consed foram utilizados e a sequência foi comparada com dados do *Gen Bank National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando o programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast). O alinhamento global das seqüências e análise filogenética foi realizado com o programa MEGA versão 4.0 (Fernandes-Salomão *et al.*, 1996).

Para determinar o perfil do crescimento do micro-organismo foi traçada uma curva de crescimento. Alíquotas de 1 mL de suspensão de esporos de 5×10^6 esporos/mL do micro-organismo *Penicillium* sp. 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 (Figura 8).

(a) (b)

Figura 8 – Aspecto visual da massa celular do *Penicillium* sp. (a) formação de *pellets* (b) dessecada.

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.

3.2.Bioprodução de pectinases

3.2.1. Cinética do tempo de reação na medida de atividade das pectinases

O estudo da cinética do tempo de reação foi avaliado com a finalidade de verificar em qual tempo de reação se obtêm a maior atividade de exo-poligalacturonase e pectina liase. Para a exo-PG empregou-se os tempos de reação de 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 30 e 40 minutos, dados em unidades de absorbância (UA). A Pectina liase (PMGL) avaliou-se nos tempos de 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100,110 e 120 minutos, em função da atividade da PMGL.

3.2.2.Efeito da concentração de esporos

A cepa do fungo filamentoso, *Penicillium brasilianum* foi cultivada em PDA durante 7 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 10^3 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para uma câmara de Neubauer (Inlab) para contagem dos esporos (Freire, 1996). Para a determinação da melhor concentração de esporos/mL para a produção de exo-PG, PMGL e PME foi realizado um estudo com diferentes concentrações de esposos/mL ($5x10^3$, $5x10^4$, $5x10^5$, $5x10^6$, $5x10^7$ e $5x10^8$) no meio de bioprodução nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. O meio de bioprodução utilizado constituia-se de 10 g/L de pectina cítrica, e 10 g/L extrato de levedura, pH inicial de 5,5 e acrescido de 1 mL de esporos, na concentração desejada, em 100 mL de meio. O pH inicial de todos os ensaios foi ajustado a 5,5 com a adição de soluções de HCl (2 M) ou NaOH (2 M). As condições de cultivo foram a 30°C, 180 rpm até 96 horas de fermentação (Uenojo, 2003).

3.2.3. Screening de variáveis para a bioprodução de pectinases

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e de condições operacionais da bioprodução das pectinases, foi utilizado um planejamento do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais. Inicialmente, a escolha das variáveis independentes foi baseada em relatos da literatura (Wang *et al.*, 2009; Maller 2008; Santos *et al.*, 2008; Niture 2008; Ustok *et al.*, 2007; Patil & Dayanand 2006; Phutela *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2004; Uenojo 2003; Dartora 2002; Castilho *et al.*, 1999; Couri *et al.*, 2000). As variáveis independentes fixas foram: temperatura (30ºC), agitação (180 rpm), $pH_{inicial}$ 5,5, baseados nos resultados obtidos na seleção de micro-organismos produtores de pectinases e a concentração de esporos foi fixada em $5x10^6$ esporos/mL, baseado nos resultados do item 3.2.2. Para a definição do tempo de bioprodução acompanhou-se a medida de atividade em 24, 48, 72 e 96 horas para as enzimas PMGL, PME, PE e PGL. Para a enzima exo-PG o tempo de bioprodução foi fixado em 24 horas a partir dos resultados obtidos no *screening* dos micro-organismos. As variáveis independentes e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman para a produção das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinesterase (PE) e pectato liase (PGL).

		Níveis		
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-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 II (g/L)	X_6	0	0,01	0,02

Variáveis Independentes Fixas: 30ºC, 180 rpm, $pH_{inicial}$ 5,5, $5x10^6$ esporos/mL

3.2.4. Exo-poligalacturonase (exo-PG)

3.2.4.1. Produção da exo-poligalacturonase em frascos agitados

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman (Tabela 3) realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3, para a bioprodução da

exo-PG. A Tabela 4 apresenta os valores codificados e reais do planejamento experimental completo 2^3 (2 pontos axiais e 1 ponto central repetido 3 vezes), sendo que as variáveis independentes estudadas foram pectina, extrato de levedura, sulfato de magnésio e as variáveis independentes fixas foram temperatura (30°C), agitação (180 rpm), $pH_{inicial}$ (5,5) e tempo (24 horas).

Tabela 4 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para produção de exo-PG.

		Níveis				
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-1,68***	***-1***	***0***	***+1***	***1,68***
Pectina (g/L)	X_1	15,2	22,0	32,0	42,0	48,8
Extrato de levedura (g/L)	X_3	1,6	5,0	10	15	18,4
Sulfato de Magnésio (g/L)	X_4	0	0,2	0,5	0,8	1,0

Variáveis Independentes Fixas: 30ºC, 180 rpm, $pH_{inicial}$5,5, 24 horas, $5x10^6$ esporos/mL.

3.2.4.2. Produção da exo-poligalacturonase em biorreator

A bioprodução de exo-PG em biorreator foi realizada empregando o meio maximixado em frascos agitados (pectina cítrica- 32 g/L, extrato de levedura- 10 g/L e sulfato de magnésio- 0,5 g/L, 180 rpm, 30°C, $pH_{inicial}$ 5,5, $5x10^6$ esporos/mL). O pH inicial de todos os ensaios foi ajustado a 5,5. Nos cultivos do biorreator (B. Braun Biostech modelo Biostat B, Alemanha), com volume total de 5 L usou-se volume de trabalho de 1 L, durante os cultivos, foi variada a frequência dos agitadores e a vazão específica (vvm - volume de ar por volume de líquido por minuto), conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 na bioprodução de exo-PG em biorreator.

		Níveis				
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-1,41***	***-1***	***0***	***+1***	***1,41***
Agitação (rpm)	X_1	180	241	390	539	600
Aeração (vvm)	X_2	0,5	0,8	1,5	2,2	2,5

*Variáveis Independentes Fixas: 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 30ºC, $pH_{inicial}$5,5, $5x10^6$ esporos/mL.

3.2.4.3. Estudo cinético da bioprodução de exo-poligalacturonase (exo-PG)

O estudo cinético de bioprodução foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas em frascos agitados (pectina cítrica - 32 g/L, extrato de levedura - 10 g/L e sulfato de magnésio - 0,5 g/L, 180 rpm, 30°C, $pH_{inicial}$ 5,5, $5x10^6$ esporos/mL), tendo como objetivo avaliar a atividade da exo-PG, o consumo de substratos (Carbono orgânico total, nitrogênio e minerais), crescimento celular e o pH em função do tempo. As amostras foram coletadas periodicamente até 60 horas de bioprodução e em seguida filtradas para a determinação da atividade de exo-PG.

Na cinética de produção de exo-PG em biorreator, empregou-se o meio maximizado obtido em frascos agitados, sendo esta realizada em todos os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 (Tabela 5). As amostras foram coletadas periodicamente (a cada 12 horas) até 96 horas de bioprodução, em seguida filtradas e realizada a medida de atividade de exo-PG.

3.2.5. Pectina lise (PMGL)

3.2.5.1. Produção da pectina liase em frascos agitados

Com base nos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman (Tabela 3) realizou-se um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 6), sendo que as variáveis estudadas foram pectina, extrato de levedura e fosfato de potássio.

Tabela 6 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para produção de PMGL.

		Níveis		
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-1***	***0***	***+1***
Pectina (g/L)	X_1	11,0	22,0	33,0
Extrato de Levedura (g/L)	X_3	10,0	20,0	30,0
Fosfato de Potássio (g/L)	X_5	2,0	4,0	6,0

Variáveis Independentes Fixas: 30ºC, 180 rpm, $pH_{inicial}$5,5, 48 horas, $5x10^6$ esporos/mL.

3.2.5.2. Estudo cinético da bioprodução de pectina liase (PMGL)

O estudo cinético de bioprodução foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas de bioprodução (33 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio nas condições de 180 rpm, 30°C e $pH_{inicial}$ 5,5, $5x10^6$ esporos/mL), tendo como objetivo avaliar a atividade da PMGL, o consumo de

substratos (Carbono orgânico total, nitrogênio e minerais), crescimento celular e o pH em função do tempo. As amostras foram coletadas periodicamente até 86 horas de bioprodução e em seguida filtradas e realizada a medida de atividade de PMGL.

3.2.6. Pectinametilesterase (PME)

3.2.6.1. Produção de pectinametilesterase em frascos agitados

De acordo com os resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman (Tabela 3) realizou-se um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 7), sendo que as variáveis independentes estudadas foram pectina, extrato de levedura, fosfato de potássio e as variáveis independentes fixas foram temperatura (30°C), agitação (180 rpm), $pH_{inicial}$ (5,5), tempo (24 horas) e $5x10^6$ esporos/mL.

Tabela 7 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para produção de PME.

		Níveis		
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-1***	***0***	***+1***
Pectina (g/L)	X_1	22,0	27,0	32,0
Extrato de Levedura (g/L)	X_3	20,0	25,0	30,0
Fosfato de Potássio (g/L)	X_5	4,0	6,0	8,0

Variável fixa: Sulfato de Ferro (0,02 g/L). Variáveis Independentes Fixas: 30ºC, 180 rpm, $pH_{inicial}$ 5,5, 24 horas, $5x10^6$ esporos/mL.

3.2.6.2. Estudo cinético da bioprodução de pectinametilesterase (PME)

O estudo cinético da bioprodução de PME foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas em frascos agitados (32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro, 180 rpm, 30°C, $pH_{inicial}$ 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL), tendo como objetivo avaliar a atividade da PME, o consumo de substratos (Carbono orgânico total, nitrogênio e minerais), crescimento celular e o pH em função do tempo. As amostras foram coletadas periodicamente até 36 horas de bioprodução e em seguida filtradas e realizada a medida de atividade de PME.

3.2.6.3. Efeito das concentrações de sais no meio reacional da medida de atividade da PME

Os experimentos foram realizados objetivando determinar qual a melhor concentração de sais (NaCl, $CaCl_2$ e NaCl/$CaCl_2$) no meio reacional para uma maior atividade de PME. As concentrações de sais variaram de 0,02 a 1 M com concentração de pectina cítrica, inicialmente, fixada em 1 % (m/v). O extrato enzimático utilizado foi obtido nas condições maximizadas de produção ($5x10^6$ esporos/mL a 30°C, 27 horas de bioprodução, $pH_{inicial}$ 5,5 e meio de cultivo composto por 32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro). A medida de atividade da PME foi conduzida segundo metodologia descrita por Hultin *et al.* (1966) com modificações. A associação dos sais foi realizada na proporção de 1:1 (v/v) em todas as concentrações.

3.2.6.4. Efeito da concentração de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME

O estudo dos efeitos da concentração de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME foi realizado variando a concentração de pectina cítrica (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 %, m/v) no meio reacional de $CaCl_2$ 0,5 M. O extrato enzimático bruto utilizado para a medida de atividade foi obtido nas condições experimentais maximizadas ($5x10^6$ esporos/mL a 30°C, 27 horas de bioprodução, $pH_{inicial}$ 5,5 e meio de cultivo composto por 32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro). A atividade da PME foi realizada segundo metodologia descrita por Hultin *et al.* (1966) com modificações.

3.2.7. Avaliação das diferentes pectinases nos extratos enzimáticos brutos maximizados

No extrato enzimático bruto maximizado de cada pectinase específica (exo-PG, PMGL e PME) avaliou-se também as atividades pectinolíticas das outras 2 enzimas, metodologia descritas nos itens 3.5.1; 3.5.2 e 3.5.5.

3.3. Caracterização parcial das pectinases

A caracterização das enzimas (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 e pHs, uma vez que tais condições podem ter uma grande variação de acordo com a origem e os meios de produção utilizados.

O extrato enzimático bruto utilizado no estudo de caracterização parcial das pectinases foi obtido a partir das condições experimentais maximizadas para cada enzima.

3.3.1. Avaliação da temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto

Na determinação dos valores ótimos de temperatura e pH para as enzimas foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2, onde o pH variou de 3 a 6 e temperatura variando de 30 a 80°C para as enzimas exo-PG e PMGL (Tabela 8), e para a enzima PME os valores de pH variaram de 5,0 a 11,0 e a temperatura de 30 a 80°C (Tabela 9).

Tabela 8 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas exo-PG e PMGL.

		Níveis				
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-1,41***	***-1***	***0***	***+1***	***1,41***
pH	X_7	3	3,4	4,5	5,5	6
Temperatura (°C)	X_8	30	37	55	73	80

Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 30°C, $5x10^6$ esporos/mL.

Tabela 9 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos da enzima PME.

		Níveis				
Variáveis Independentes*	***Códigos***	***-1,41***	***-1***	***0***	***+1***	***1,41***
pH	X_7	5,0	5,54	7,0	9,8	11,0
Temperatura (°C)	X_8	30	37	55	73	80

Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 30°C, $5x10^6$ esporos/mL.

Os extratos enzimáticos brutos das enzimas exo-PG e PMGL foram submetidos a diferentes pH (3,0; 3,4; 4,5, 5,5 e 6,0) e incubados em banho-maria (Nova Ética) nas temperaturas de 30, 37, 55, 73 e 80°C, respectivamente. Para o ajuste do pH do extrato enzimático bruto da exo-PG, o tampão biftalato de potássio/HCl (0,1 M) foi utilizado para ajustar o pH a 3,0 e 3,4 e o tampão fosfato de sódio (0,1 M) para os pHs 4,5; 5,5 e

6, respectivamente. Já para o extrato enzimático bruto da PMGL os pHs foram ajustados com solução tampão Tris-HCl 0,05 M nos respectivos valores de pH (3,0; 3,4; 4,5, 5,5 e 6,0). O extrato enzimático bruto da PME foi titulado nos respectivos valores de pH (5,0; 5,54; 7,0; 9,8 e 11,0) com NaOH 0,01 M.

3.3.2. *Avaliação da temperatura de estabilidade*

A fim de determinar a temperatura de estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG, esta foi submetido a altas (25, 35, 45 e 55°C) e baixas (4, -10 e -80°C) temperaturas. Já os extratos bruto da PMGL e PME foram submetidos a altas (30, 40 e 50, 60 e 70°C) e baixas (4, -10 e -80°C) temperaturas. O extrato enzimático bruto da PME também foi submetido a temperatura de 100°C. A estabilidade frente a temperatura foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática.

3.3.3. Avaliação do extrato enzimático bruto quanto a estabilidade ao pH

O pH do extrato enzimático bruto da exo-poligalacturonase foi ajustado com diferentes tampões: biftalato de potássio/HCl (0,1 M) para o pH 4,0; fosfato de sódio (0,1 M) para os pHs 5,0, 6,0 e 7,0 e solução de Kolthoff (0,1 M) para os pH 9,0 e 11,0, respectivamente. A dosagem de atividade da exo-PG foi realizada utilizando tampão acetato de sódio em pH 4,5 e temperatura de 40°C.

A estabilidade da PMGL frente ao pH, foi realizada incubando o extrato enzimático bruto a 40°C, e determinada a medida de atividade em temperatura de 40°C com o pH do meio reacional (Tris-HCl 0,05 M mais 1% de pectina cítrica) ajustado para 3; 3,4; 4,5; 5,5; 6, 7 e 8 com tampão Tris-HCl 0,05 M.

Na determinação da estabilidade da PME frente ao pH, o extrato enzimático bruto foi incubado a 40°C (*Shaker* - Nova Ética), e determinada a medida de atividade em temperatura de 40°C com o pH do meio reacional ($CaCl_2$ 0,5 % de pectina) ajustado a pH 5, 7, 9 e 11 com NaOH 0,01 M.

A estabilidade frente ao pH foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática.

3.3.4.Determinação da energia de ativação (Ea)

A energia de ativação foi estimada a partir da declividade da reta obtida no gráfico contendo valores do logaritimo neperiano (ln) da atividade enzimática inicial (Ao) nos ensaios contra o inverso da temperatura em graus Kelvin (°K). Obtidas as

regressões lineares entre estes valores, foi calculada a energia de ativação (Lehninger, Nelson & Cox,1995), que estabeleceu que essa declividade é proporcional a energia de ativação (-K = -Ea/R), onde K é a declividade da reta e R a constante dos gases. Essa constante foi determinada apenas para as amostras da exo-PG, pois as outras enzimas não atingiram queda de 50 % nas suas atividades residuais no período analisado.

3.4. Potencial de aplicação das pectinases em suco

Para avaliar a potencialidade das pectinases (exo-PG, PMGL e PME) na clarificação de sucos de frutas, foram realizados ensaios prévios utilizando suco de pêssego comercial (Néctar de pêssego - Sarandi). Para o tratamento enzimático do suco de pêssego foram utilizados os extratos enzimáticos brutos obtidos em condições maximizadas de bioprodução da exo-PG, PMGL e PME, respectivamente, nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 % (v/v) a temperatura de 40°C (temperatura ótima de reação destas enzimas) durante 60 minutos, sob agitação constante de 100 rpm. Alcançado o tempo de tratamento, pré-determinado segundo Sandri *et al.* (2011), realizou-se o processo de resfriamento (banho de gelo) das amostras a fim de interromper a reação. Após o tratamento enzimático as amostras foram filtradas em papel filtro (Whatmam n°1) para as determinações analíticas. Como controle de reação, as preparações enzimáticas foram substituídas por água destilada.

3.5. Determinações analíticas

3.5.1. Atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG)

A atividade pectinolítica de exo-poligalacturonase (exo-PG) foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalisílico (DNS), proposto inicialmente por Miller (1956) com algumas modificações.

A solução de DNS foi preparada dissolvendo-se, a quente, 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH em 1416,0 mL de água destilada. A seguir foram adicionados 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

Inicialmente, adicionou-se 1 mL de substrato (solução 0,5 % de pectina cítrica em tampão acetato pH 4,5) e incubou-se a 40°C por 15 minutos para estabilização de temperatura. Em seguida adicionou-se 1 mL de extrato enzimático e incubado a 40°C por 6 minutos (definido a partir dos resultados apresentados item 4.2.1), então 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 Coutler, modelo DU640) a 540 ηm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto (U=μmol/min) segundo uma curva padrão estabelecida com ácido α-D-galacturônico (Fluka Chemica, massa molecular 212,16) como açúcar redutor. A atividade da exo-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.

3.5.2. Atividade de pectina liase (PMGL)

A atividade da pectina liase foi determinada segundo método de Ayers *et al.* (1966), descrito por Pitt (1988) com modificações. O método determina os produtos insaturados finais da degradação da pectina pelo ácido tiobarbitúrico. A mistura de reação consistiu em 5,0 mL da solução de pectina 1,0 % em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5; 1,0 mL da solução de $CaCl_2$ 0,01 M; 1,0 mL do extrato bruto enzimático e 3,0 mL de água destilada. Após a incubação por 10 minutos a 30ºC, foi adicionado 0,6 mL de uma solução de $ZnSO_4$ 7.H_2O 9 % em seguida 0,6 mL de NaOH 0,5 M. As proteínas precipitadas do substrato não consumido serão removidas por centrifugação (modelo Mikro 20) a 3000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante (5 mL) foi adicionado à mistura de 3,0 mL do ácido tiobarbitúrico 0,04 M; 1,5 mL de HCl 0,1 M e 0,5 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria (Nova Ética) por 30 minutos, resfriada e medida a absorbância à 550 nm. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorbância à 550 nm, nas condições do ensaio (Pitt,1988).

3.5.3. Atividade de pectato liase (PGL)

A atividade de PGL foi determinada pela formação de produtos insaturados a partir de ácido poligalacturônico (PGA) em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640) a 230 nm. A mistura de reação-padrão foi de 3 mL de PGA (Sigma), 1,0 % (p/v) em tampão Tris/HCl 0,1 M, pH 8,5 e 0,5 mL do sobrenadante do extrato bruto enzimático. A reação ocorreu a 25°C por um período de 40 minutos. Alíquotas de

0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 40 minutos de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, interrompendo, assim, a reação. Uma unidade de atividade de PGL foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 µmol de produtos insaturados por mililitro da cultura por minuto, utilizando-se para cálculo o coeficiente de absorção molar do produto insaturado como sendo de 5.200 L cm^{-1} mol^{-1} (Moran *et al*., 1968).

3.5.4. Atividade de pectinaesterase (PE)

A determinação da atividade da pectinaesterase foi realizada através de determinação colorimétrica onde 10 mL de verde de bromocresol (0,017 g/mL) foi adicionado a 90 mL de solução de pectina cítrica (0,5 g/100 mL), e em seguida o pH desta foi ajustado para o valor de 5,1 com solução de NaOH 1 mol/L. A reação foi monitorada em 617 nm em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640). Após a determinação da absorbância de 1,95 mL da solução de pectina, termostatizada a 25ºC, a reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato enzimático e a diminuição da taxa de absorção em 617 nm (Δ A_{617nm}/min) foi registrada durante 30 segundos. Uma curva foi plotada, utilizando diferentes quantidades de ácido galacturônico em vez da amostra de enzima, a fim de determinar a equivalência entre ΔA_{617nm} e µEq dos grupos carboxilato liberados (Vilariño *et al.*, 1993).

3.5.5. Atividade de pectinametilesterase (PME)

A atividade de pectinametilesterase (PME) foi determinada segundo método titulométrico descrito por Hultin *et al.* (1966) com modificações (temperatura controlada a 20°C ± 2). Um mililitro do extrato enzimático foi adicionado sobre 30 mL de pectina cítrica 1 % em NaCl 0,2 M. O pH da solução foi mantido em torno de 7,0, por 10 minutos, com NaOH 0,01 N. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 µmol de NaOH min^{-1} mL^{-1}, nas condições do ensaio.

3.5.6. pH

O pH foi monitorado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed) após calibação com soluções tampão a pH 4,0, 7,0 e 11,0.

3.5.7. Carbono orgânico total (COT)

O teor de Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680°C e detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH (AOAC, 1995).

3.5.8. Macro e microminerais

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjedahl (VELP DK-20 e UDK-126D) segundo metodologia da AOAC (1995).

Magnésio, potássio, manganês e ferro foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama - FAAS (Varian Spectra AA-55), segundo metodologia descrita pela AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Mg, K, Mn, e Fe como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Mg, K, Mn e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Mg, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrões na proporção de 1 % (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrão.

3.5.9. Avaliação de características físico-químicas do suco

No suco com tratamento e sem tratamento enzimático (controle) foram avaliadas as seguintes características físico-químicas: pH e sólidos solúveis totais (ºBrix), em refratômetro Abbe conforme metodologias descritas por IAL (2005); viscosidade em viscosímetro "Falling Ball" (Valle & Vasconcellos, 1997).

A clarificação do suco de pêssego foi determinada com base na intensidade de cor (IC), as leituras das absorbâncias foram realizadas nos comprimentos de onda 440 nm e 520 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640), sendo a primeira correspondente à cor amarela, resultante da oxidação dos polifenóis, e a segunda à cor vermelha resultante dos pigmentos antocianínicos da fruta (Tanner & Brunner,1985). A intensidade de cor (IC) foi expressa com base na soma das absorbâncias das 440 nm e 520 nm (Equação 1).

$$IC = A_{440} + A_{520} \quad (1)$$

A clarificação foi expressa em % de clarificação, calculada com base na intensidade de cor do suco controle e do suco tratado, de acordo com a equação 2.

$$\text{Clarificação (\%)} = \frac{\text{IC do suco controle - IC do suco tratado}}{\text{IC do suco controle}} \times 100 \quad (2)$$

A redução da turbidez no suco foi calculada com base na absorbância, medida no comprimento de onda de 540 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640) conforme metodologia descrita por Chatterjee *et al.* (2004). A redução da turbidez foi expressa em % de redução de turbidez, calculada com base na absorbância (Abs) do suco controle e do suco tratado, de acordo com a equação 3.

$$\text{Redução da turbidez (\%)} = \frac{\text{Abs do suco controle - Abs do suco tratado}}{\text{Abs do suco controle}} \times 100 \quad (3)$$

3.5.10. Tratamentos estatísticos

Os resultados da produção de pectinases e da caracterizaçao parcial (pH e temperatura ótimos) foram tratados estatísticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxilio do software *Statistica* versão 8.0, com nível de significância de 95% de confiança.

Os dados referentes ao *screening* fermentativo dos micro-organismos, influência da concentração de esporos na bioprodução; cinética de bioprodução, biomassa, evolução do pH e consumo de substratos além da estabilidade da exo-PG foram representados graficamente mediante média (triplicata) e barra de desvio padrão.

Os resultados do tempo de reação na medida de atividade (exo-PG e PMGL), da estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL e PME, os efeitos da concentração de sais e pectina na medida de atividade da PME, bem como a avaliação da redução de viscosidade, turbidez, índice de clarificação, pH e sólidos solúveis na aplicação dos extratos enzimáticos brutos no tratamento de suco foram tratados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey a nível de 95% de confiança com softwere *Statistica* versão 8.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes ao isolamento, seleção e identificação dos micro-organismos produtores de pectinases. Além disso, o estudo da maximização e/ou otimização da bioprodução de pectinases (exo-poligalacturonase, pectina liase, pectinametilesterase, pectato liase e pectinaesterase) em meio complexo, empregando a cepa isolada e identificada com potencial pectinolítico, bem como a caracterização parcial e potencial de aplicação das enzimas (exo-PG, PMGL e PME).

4.1. *Screening* de micro-organismos pectinolíticos

Devido a importância destas enzimas em processos industriais é de grande relevância, estudos que visam o isolamento e seleção de micro-organismos com potencial de produção de pectinases, visando o isolamento de micro-organismo de interesse a partir de substratos de baixo custo, reduzindo custos de produção e de dependências externas de importação de enzimas.

4.1.1. Isolamento e seleção dos micro-organismos

Os micro-organismos isolados foram procedentes de amostras de laranja (E), mamão (I), pêssego (H), melão (J), goiaba (L), banana (G), casca de uva (O), solos de videiras (R), kiwi (S), chás (D), produtos processados em decomposição (K), amostras de farinha de trigo (B) e amostras de folhas de eucalipto e laranjeira (W), sendo que a maior quantidade de micro-organismos isolados foram procedentes de amostras de eucalipto, laranjeira, folhas de laranjeiras (49), goiaba (8), pêssego (4), farinhas (3) e manga (3). No *screening* de micro-organismos foram isolados e selecionados um total de 92 micro-organismos, sendo que por observação em microscópio ótico e meio seletivo, identificou-se 76 fungos filamentosos, 16 bactérias e nenhuma levedura.

A literatura reporta alguns estudos de isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas pectinolíticas. Soares *et al.* (1999) isolaram 168 linhagens de bactérias, sendo identificadas 6 linhagens de *Bacillus* sp.. Kashyap *et al.* (2000) isolaram cepas de *Bacillus* sp. de solos e resíduos de frutas. Lima (2006) isolou um total de 50 cepas de *Aspergillus* oriundos de solos.

A Figura 9 (Tabela 44, Apêndice I) apresenta os resultados da atividade de Exo-PG dos micro-organismos. As cepas que apresentaram potencial de atividade de Exo-

PG, de aproximadamente 4 U/mL, foram *A. niger* ATCC 1004, *A. niger* ATCC 16404 e a isolada D2 em 24 horas de fermentação e as isoladas W12, H8, L1, L4 e T2 em 48 horas de fermentação, ressaltando que as mesmas não diferiram estatisticamente ($p<0,05$) entre si, na atividade exo-poligalacturonásica.

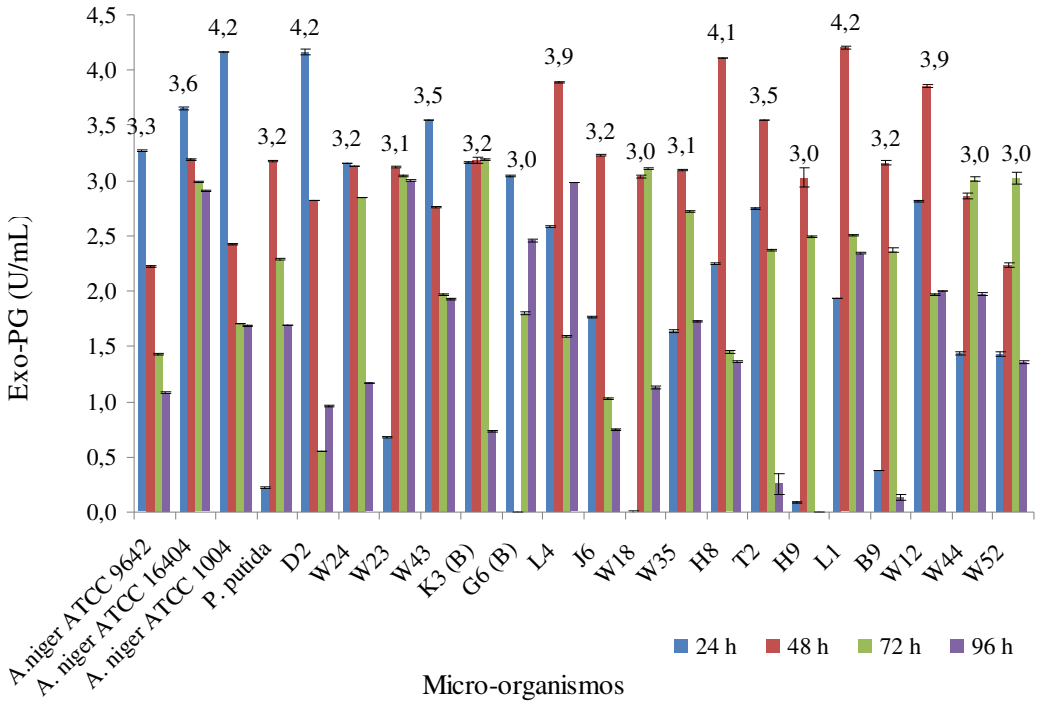


Figura 9 - Atividade de exo-poligacturonase (U/mL) dos micro-organismos *A.niger* ATCC 9642 , *A. niger* ATCC 16404 , *A. niger* ATCC 1004 , *P. putida* e dos isolados D2, W24, W23, W43, K3 (B), G6 (B), L4, J6, W18, W35, H8,T2, H9, L1,B9, W12, W44 e W52, nas 24, 48, 72 e 96 horas de bioprodução.

Ao comparar os resultados de PG (Figura 9 e Apêndice I) com os reportados na literatura, pode-se observar que as atividades pectinolíticas (Exo-PG) foram semelhantes. Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), obtiveram 3,0 U/mL de PG por *A. niger*, através de fermentação submersa em meio contendo pectina de citrus. Soares *et al.* (1999) isolaram 168 linhagens bacterianas capazes de utilizar pectina de citrus como única fonte de carbono. Destas, 6 linhagens de *Bacillus* sp. foram as melhores produtoras da enzima (0,3 a 4,0 U/mL). Soares *et al.* (2001) obtiveram cerca de 2,0 U/mL de PG, produzida por *Bacillus* sp. através de fermentação em estado sólido de farelo de trigo. Lima (2006) isolou 50 cepas de *Aspergillus* oriundos de solos e borra

oleosa, onde o *A. tubingensis* Luc 40 F4C1, nas condições de cultivo estudadas excretou, a partir de 48 horas, endopoligalaturonases (EndoPG) e exopoligalacturonases (ExoPG), determinando-se as atividades máximas de EndoPG (0,50 U/mL) em 96 horas e ExoPG expressou atividade máxima (0,10 U/mL) em 48 horas. Kawano *et al.* (2008) avaliaram o potencial de diferentes linhagens de fungos filamentosos quanto a atividades enzimáticas sendo que a maior atividade foi de 1,03 U/mL. Martins *et al.* (2008) em seu estudo com *Thermoascus aurantiacus,* obtiveram a máxima atividade de PG de 5,0 U/mL.

4.1.2. Identificação dos micro-organismos

Pré-identificação dos Micro-organismos e Análise de RAPD

A identificação dos micro-organismos produtores de exo-PG foi realizado pela avaliação das características morfológicas da reprodução e diferenciação genética por marcadores moleculares. As cepas de maior produção de exo-PG (atividades superior a 3 U/mL) foram identificadas pela técnica de microcultivo, baseada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo das estruturas vegetativas e de frutificação das cepas de cada micro-organismo.

De um total de 18 micro-organismos selecionados, 2 foram pré-identificados como sendo bactérias (K3 e G6) e 16 fungos filamentosos. Dos fungos filamentosos, 11 pertencem ao gênero *Penicillium* sp., os quais foram inicialmente codificados como B9, D2, L4, T2, W12, W23, W24, W28, W35, W43, W52, 3 cepas ao gênero *Aspergillus* sp. (H8, L1, L6), uma (H9) ao *Rhizopus* sp. e outra ao *Cephalosporium* sp.(W18).

Devido à dificuldade de identificação morfológica, tanto dos fungos filamentosos como das bactérias isoladas e selecionadas neste trabalho, procedeu-se uma análise genética através de marcadores moleculares RAPD, visando identificar possíveis duplicações de cepas.

Inicialmente foi realizada a seleção de *primers* para posterior análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), onde foram testados 40 *primers* pertencentes aos kits de *primers* randômicos OPA, OPH, OPW e OPY da OPERON *Technologies*, escolhidos aleatoriamente. Na Tabela 10 foram considerados para a análise 10 *primers*, para os fungos filamentosos e as bactérias sendo observado 100 e 98 fragmentos, com número médio de fragmentos por *primer* de 10 e 9,8, podendo-se observar um alto polimorfismo entre os micro-organismos pectinolíticos de 100 % e 92,85 %, respectivamente.

Tabela 10 - Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada *primer* utilizado para os micro-organismos pectinolíticos.

Primers	*Seqüência (5' para 3')*	*Fungos*		*Bactérias*	
		Total de fragmentos	*Fragmentos polimórficos*	*Total de fragmentos*	*Fragmentos polimórficos*
OPY 18	GTGGAGTCAG	12	11	10	10
OPA 17	GACCGCTTGT	12	12	11	10
OPH 03	AGACGTCCAC	11	11	9	8
OPA 12	TCGGCGATAG	10	9	7	7
OPW 18	TTCAGGGCAC	12	11	12	13
OPW 20	TGTGGCAGCA	9	8	14	13
OPY 15	AGTCGCCCTT	9	9	8	8
OPY 09	AGCAGCGCAC	11	11	6	6
OPY 01	GTGGCATCTC	10	10	8	5
OPW 16	CAGCCTSCCA	7	7	13	11
Total de fragmentos		100	96	98	91
% de polimorfismo		96		92,85	

A Figura 10 mostra a variabilidade observada entre os micro-organismos pectinolíticos utilizando o *primer* OPY-15.

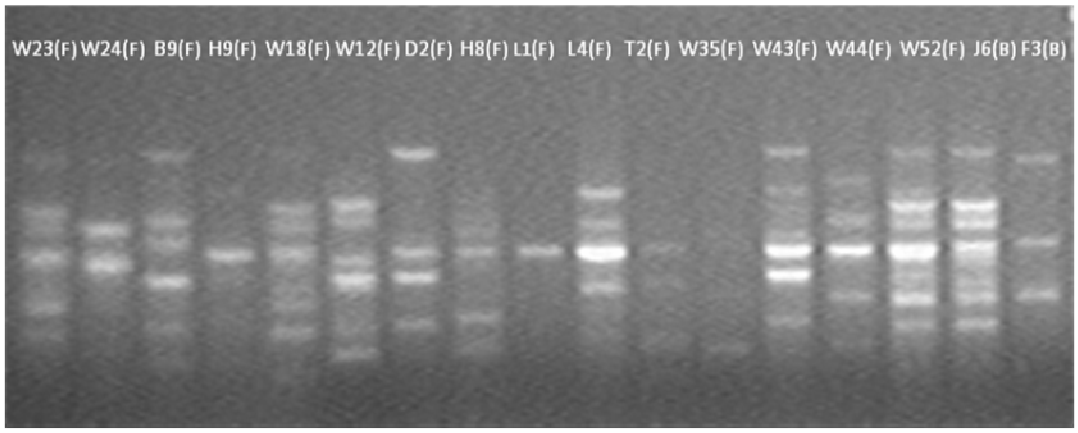


Figura 10 - Gel de agarose (1,4 %) demonstrativo obtido com o *primer* OPY-15 para os micro-organismos pectinolíticos.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre os fungos filamentosos pectinolitícos estudados neste trabalho variou entre 0,28 a 0,60. Para as bactérias pectinolíticas estudadas o índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) foi de 0,30.

Estes resultados indicam a existência de uma alta variabilidade entre as cepas, indicando tratar-se de espécies ou até gêneros distintos de fungos e bactérias.

As Figuras 11 e 12 apresentam os dendrogramas obtidos para os micro-organismos produtores de exo-poligalacturonase. Analisando os dendrogramas observa-se um alto polimorfismo, este resultado é importante, pois evita a duplicação dos trabalhos nas etapas de otimização de produção e de purificação dos biocompostos. No dendograma apresentado na Figura 11 foram analisados os fungos filamentosos produtores de exo-poligalacturonase e na Figura 12 foram analisadas as bactérias (K3 e G6) produtoras de exo- poligalacturonase (PG).

Em relação à similaridade genética por RAPD dos micro-organismos potenciais para produção de exo-poligalacturonase, a aplicação da técnica permitiu observar que os micro-organismos são de espécies ou até gêneros distintos.

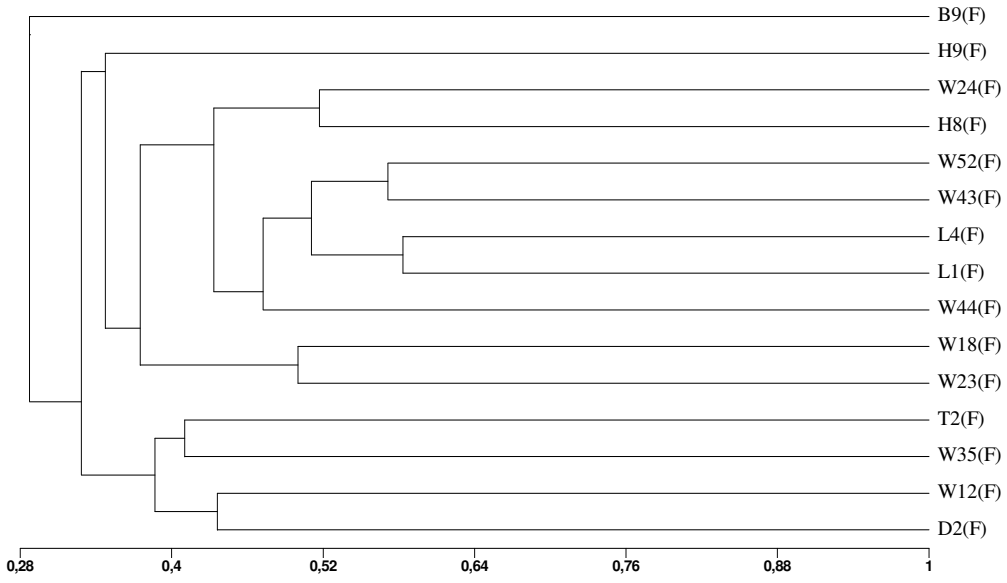


Figura 11 - Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD dos fungos produtores de exo-poligalacturonase (exo-PG).

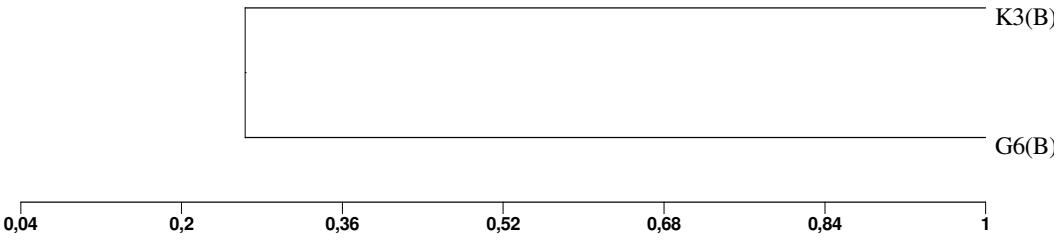


Figura 12 - Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD das bactérias produtores de exo-poligalacturonase (exo-PG).

Identificação do micro-organismo Penicillium sp. (*D2)*

O micro-organismo D2 isolado, selecionado e pré-identificado, pertencente ao gênero *Penicillium* sp. e por apresentar maior atividade exo-poligalacturonásica (4,2 U/mL) em 24 horas (Figura 9) foi identificado como sendo o *Penicillium brasilianum*, com 100 % de homologia, quando comparados com sequências de referência do domínio D1/D2 do NCBI (Kurtzman, 2006). Além disso, uma análise de dendrograma também confirmou a identidade do isolado *Penicillium* sp. (D2) com polimorfísmo de 97 %, quando comparado às espécies de *Penicillium* sp..

4.2. Bioprodução de pectinases

4.2.1. Cinética do tempo de reação na medida de atividade das pectinases

O estudo da cinética do tempo de reação da medida da atividade foi avaliado para as enzimas exo-poligalacturonase e pectina liase.

Exo-Poligalacturonase (exo-PG)

A Tabela 11 apresenta a medida da atividade exo-poligalacturonase expressa em unidade de absorbância (U.A) em função do tempo de reação. Os tempos 3; 5; 6; 7,5; 10; 12,5 e 15 minutos não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$), podendo as determinações de atividade serem realizadas todas a partir do tempo de 3 minutos. A partir destes resultados, o tempo de 6 minutos foi escolhido para a realização de todas as análises devido a não diferir significativamente ($p < 0,05$) do tempo 3 minutos, que é um tempo relativamente pequeno.

Tabela 11– Atividade da exo-poligalacturonase (U.A) durante 15 minutos de reação.

Tempo (min)	**Atividade exo-PG (U.A)*
1	1,307 ± 0,107 [b]
2	1,342 ± 0,040 [b]
3	1,834 ± 0,033 [a]
5	1,847 ± 0,142 [a]
6	1,849 ± 0,074 [a]
7,5	2,030 ± 0,125 [a]
10	1,835 ± 0,014 [a]
12,5	2,020 ± 0,065 [a]
15	2,007 ± 0,133 [a]

*Média ± desvio 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 da exo-poligalacturonase. Soares *et al.* (1999) realizaram estudo de medida de atividade de PG em incubação a 40°C e 10 minutos de reação, obtendo atividade de 0,3 a 0,8 U/mL por *Bacillus sp* em fermentação submersa. Maller (2008) realizou a medida de atividade de PG incubando por 10 minutos a 40°C, obtendo atividade que variaram de 0,01 a 0,24 U/mL utilizando fungo filamentoso *A. niveus.*

Pectina liase (PMGL)

A fim de otimizar o tempo de reação para a determinação da atividade da PMGL realizou-se um estudo cinético. A Tabela 12 apresenta a atividade de pectina liase expressa em U/mL em função do tempo de reação, onde observa-se que não há diferença significativa a nível de 95 % de confiança em todos os tempos de reação, podendo as determinações de atividade serem realizadas todas a partir do tempo de 5 minutos. A partir destes resultados, o tempo de 10 minutos foi escolhido para a realização de todas as análises devido a não diferir significativamente ($p < 0,05$) dos demais tempos e por considerar o tempo de 5 minutos relativamente pequeno.

Escassas são as informações sobre estudo cinético de medida de atividade da pectina liase, Paula (2001) estudando o crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.) avaliou o tempo de reação da medida de atividade da PMGL e verificou que intervalos de 5 e 30 minutos de reação são confiáveis para a PMGL produzida a partir do *P. amylolyticus.*

Tabela 12 - Atividade da pectina liase (U/mL) durante 120 minutos de reação.

Tempo (min)	**Atividade de PMGL (U/mL)*
5	10,74 ± 1,92 [a]
7,5	11,91 ± 2,91 [a]
10	15,66 ± 1,86 [a]
12,5	12,82 ± 3,01 [a]
15	10,76 ± 2,01 [a]
20	12,46 ± 3,02 [a]
25	10,15 ± 2,00 [a]
30	9,97 ± 2,01 [a]
35	12,04 ± 2,06 [a]
40	10,46 ± 3,01 [a]
50	10,44 ± 1,98 [a]
60	12,24 ± 2,00 [a]
70	13,28 ± 2,95[a]
80	12,26 ± 1,96 [a]
90	11,64 ± 1,98 [a]
100	10,62 ± 3,00 [a]
110	15,75 ± 1,90 [a]
120	13,01 ± 2,02 [a]

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

4.2.2. Efeito da concentração de esporos

A concentração de esporos, numa solução para inóculo, mostra-se muito importante, uma vez que a quantidade de esporos viáveis inoculados poderá influenciar na bioprodução de pectinases. Para comprovar esta hipótese e verificar se há uma quantidade ideal de esporos para o inóculo na produção de enzimas pectinolíticas, analisou-se a concentração da solução de esporos ($5x10^3$ a $5x10^8$ esporos/mL) para o *Penicillium brasilianum* em meio líquido a base de pectina cítrica.

As Figuras 13, 14 e 15 são referentes a produção de exo-poligalacturonase (exo-PG), pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME), respectivamente. Observou-se que a maior atividade enzimática de exo-PG (15,26 U/mL em 24 horas), PMGL (5,34 U/mL em 48 horas) e PME (3,0 U/mL em 24 horas) foram obtidas na concentração de esporos igual a $5x10^6$ esporos/mL. Desta forma, definiu-se a concentração de esporos em $5x10^6$ esporos/mL de *Penicillium brasilianum* para todas as enzimas pectinolíticas bioproduzidas neste trabalho.

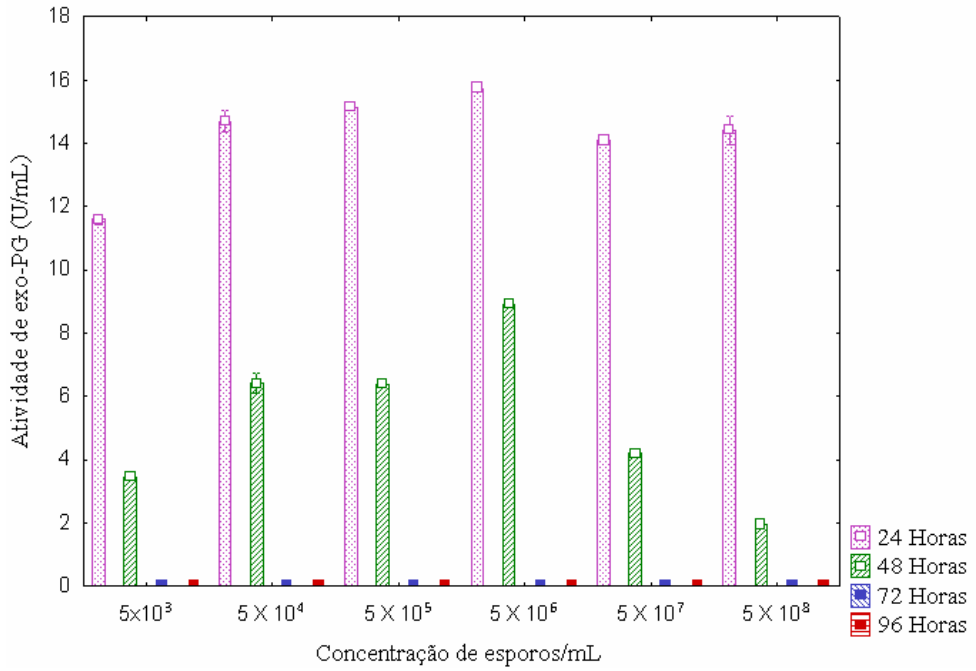


Figura 13 – Produção de exo-poligalacturonase (exo-PG) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum*.

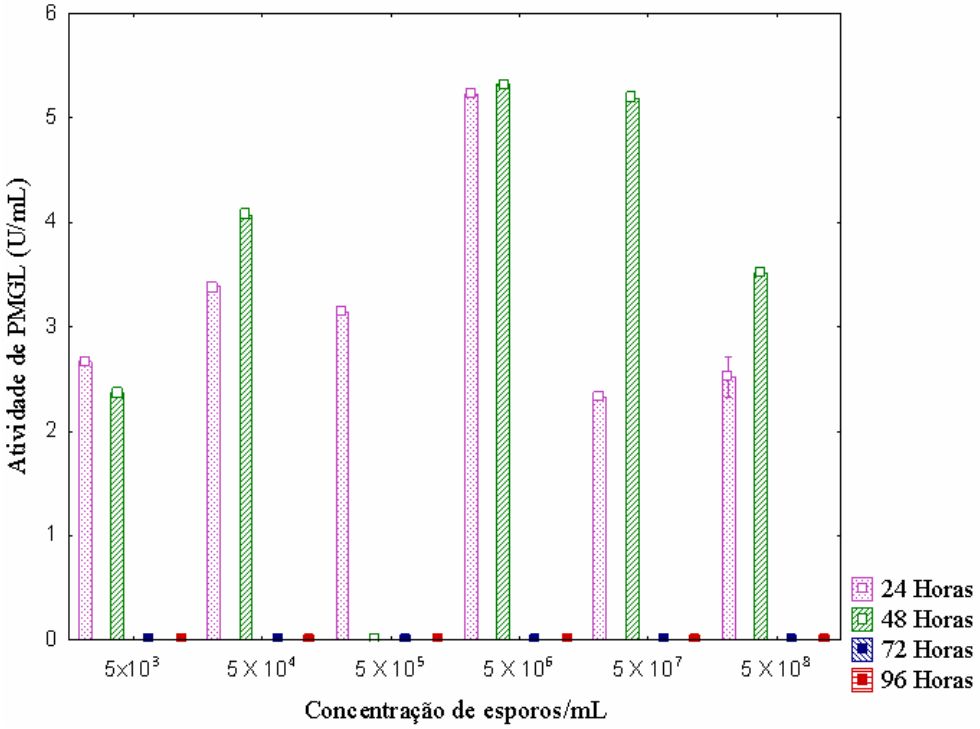


Figura 14 – Produção de pectina liase (PMGL) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum*.

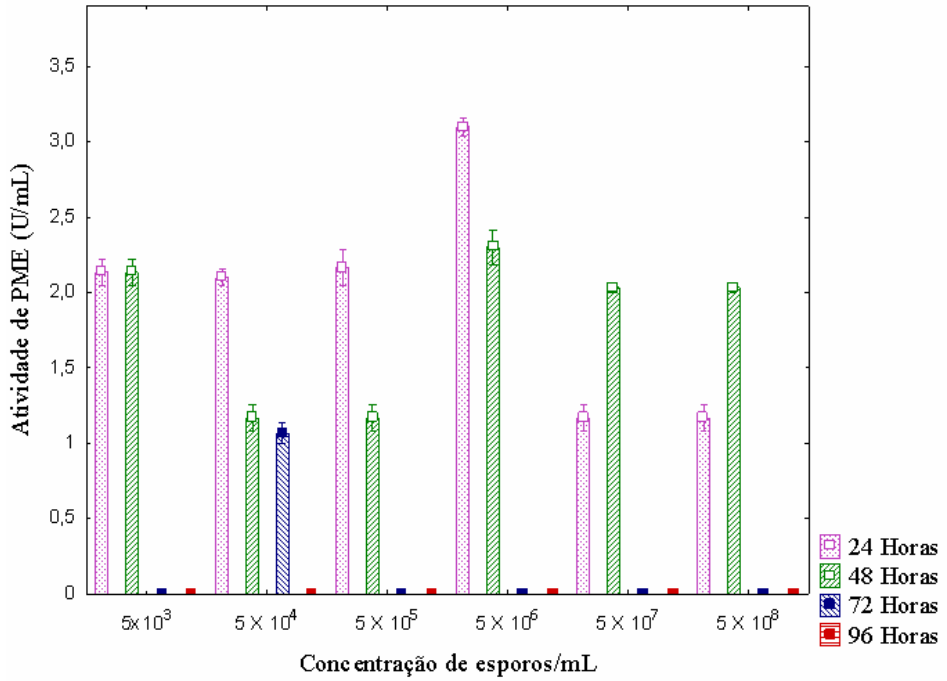


Figura 15 – Produção de pectinametilesterase (PME) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum*.

Assim como neste estudo, Gomes *et al.* (2010) obtiveram os melhores resultados para produção de exo-PG (51,82 U/mL) em meio complexo com a concentração de esporos igual a $5x10^6$ esporos/mL. Teixeira *et al.* (2000) estudando os efeitos de diferentes fontes de carbono na atividade de pectinesterease, endo e exo-poligalacturonase de *Aspergillus japonicus* 586, em meio líquido (soluções de Manachini) suplementado com diferentes concentrações de substratos, usou inóculo com concentração de esporos igual a $5x10^6$ esporos/mL e obtiveram atividades de 5,7; 0,463 e 0,5 U/mL para a pectinesterease, endo e exo-poligalacturonase, respectivamente. Camargo *et al.* (2005) estudando a produção da poligalacturonase e a produção e purificação de pectina liase extracelulares a partir de *Aspergillus* sp. isolado do solo, crescido em cultivo submerso e em meio contendo bagaço de laranja ou pectina cítrica como única fonte, usaram concentração de 10^6 esporos/mL e obtiveram atividade de 3,6 U/mL e 11,3 U/mL para poligalacturonase e pectina liase após 48 e 168 horas, respectivamente.

4.2.3. Screening de variáveis para a bioprodução de pectinases

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento tipo Plackett-Burman com os valores codificados e reais das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinesterase (PE) e pectato liase (PGL) produzidas por *Penicillium brasilianum*, respectivamente.

Tabela 13 - Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores reais e codificados) e respostas em produção das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinesterase (PE) e pectato liase (PGL).

Ensaios	*Variáveis Independentes**						*Pectinases (U/mL)*				
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	*Exo-PG 24 horas*	*PME 24 horas*	*PMGL 48 horas*	*PE 48 horas*	*PGL 48 horas*
1	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	42,52	1,00	5,97	0,0257	0
2	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	44,92	0,40	2,36	0,3599	0
3	-1 (2)	1 (4)	1(20)	-1 (0)	1 (4)	-1 (0)	5,67	2,00	2,22	0,0429	0,0393
4	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	13,51	1,00	5,19	0,0086	0
5	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	31,78	1,30	6,81	0,0171	0,0204
6	1 (22)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	18,25	2,50	5,70	0,0060	0,0843
7	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	8,16	0,60	1,31	0,3000	0
8	-1 (2)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	6,89	2,00	3,45	0,0060	0
9	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	1 (0,02)	7,26	0,80	2,80	0,0171	0
10	1 (22)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	49,30	1,50	6,31	0,0043	0,0122
11	-1 (2)	1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,02)	11,01	0,20	0,07	0,0257	0,0142
12	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	12,09	0,00	0,76	0,0171	0,0015
13	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	19,27	1,20	6,86	0,0086	0,0159
14	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	19,27	1,10	6,55	0,0086	0
15	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	18,01	1,00	6,99	0,0051	0,0113

*X_1= Pectina (g/L), X_2= L-Asparagina (g/L), X_3= Extrato de levedura (g/L), X_4= Sulfato de magnésio (g/L), X_5= Fosfato de potássio (g/L), X_6= Sulfato de Ferro II (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, pH 5,5.

Exo-poligalacturonase (exo-PG)

Conforme resultados apresentados na Tabela 13, a máxima atividade exo-poligalacturonásica (49,30 U/mL) foi obtida no ensaio 10, onde o meio de cultivo apresentava as maiores concentrações de pectina cítrica (22 g/L), fosfato de potássio (4 g/L) e sulfato de ferro II (0,02 g/L). A Figura 16 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas.

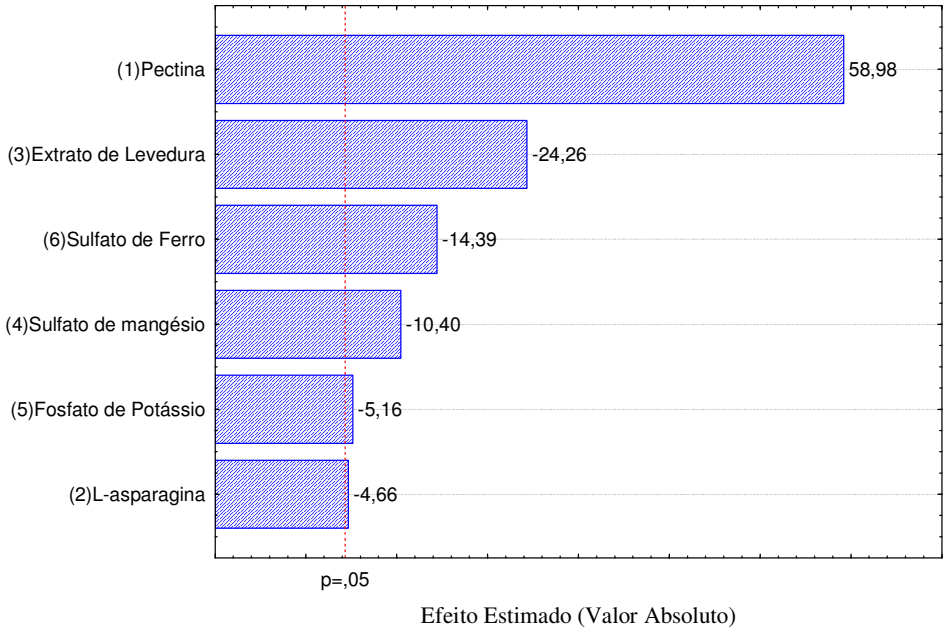


Figura 16 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental do tipo Plackett–Burman, para a produção de exo-poligalacturonase (U/mL).

Verifica-se (Figura 16) que a variável pectina cítrica apresentou efeito significativo positivo a nível de confiança de 95%, demonstrando que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para o +1 possivelmente ocasionará um incremento na atividade exo-poligalacturonásica. As variáveis L-asparagina, fosfato de potássio e sulfato de ferro (II) apresentaram efeito significativo ($p<0,05$) negativo. Portanto, como L-asparagina, fosfato de potássio e sulfato de ferro (II) no nível –1, a concentração usada foi nula, estas variáveis foram excluídas do processo fermentativo. Entretanto, as variáveis sulfato de magnésio e extrato de levedura apresentaram efeito significativo ($p<0,05$) negativo e no nível –1, a concentração usada foi nula, estas variáveis também poderiam ser excluídas do processo fermentativo, mas observando a Tabela 13, podemos observar altas atividades com

concentrações de extrato de levedura e sulfato de magnésio. A partir destes resultados as faixas das variáveis foram deslocadas e um planejamento fatorial 2^3 foi realizado e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Pectina liase (PMGL)

De acordo com resultados apresentados na Tabela 13, a máxima atividade de pectina liase foi obtida no ensaio 5 e pontos centrais com atividade de aproximadamente 6,81 U/mL, onde o meio de cultivo continha concentrações de 22 g/L de pectina, 4,0 g/L de L-Asparagina, 1 g/L sulfato de magnésio, 4,0 g/L fosfato de potássio e sem adição de extrato de levedura e sulfato de ferro (II). O tempo de bioprodução para a enzima PMGL foi fixado em 48 horas em função da máxima atividade verificada na cinética de bioprodução de PMGL (Tabela 45, Apêndice II).

A Figura 17 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett–Burman.

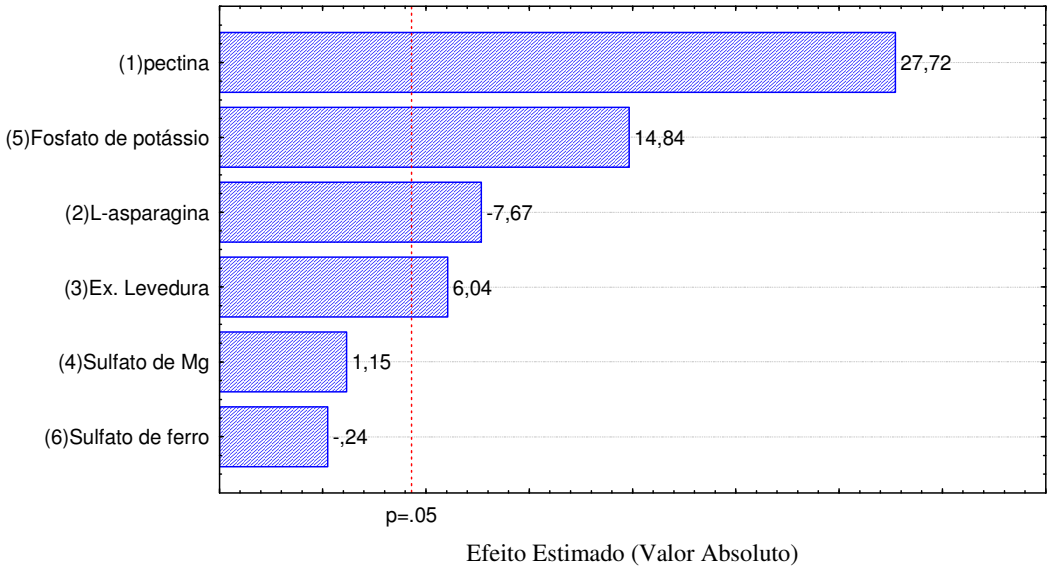


Figura 17 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental do tipo Plackett–Burman, para a produção de pectina liase (U/mL).

Verifica-se (Figura 17) que as variáveis pectina, extrato de levedura e fosfato de potássio tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95 %, o que significa que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para o +1 possivelmente ocasionará um incremento na atividade enzimática. Entretanto, a

variável L-asparagina apresentou efeito significativo (p<0,05) negativo, portanto, como no nível –1, a concentração foi nula, esta variável foi excluída do processo fermentativo. Pelos resultados apresentados acima, os níveis de pectina, extrato de levedura e fosfato de potássio foram deslocados para valores superiores, a fim de maximizar a produção de pectina liase.

Baseado nos resultados de bioprodução de PMGL demonstrados na análise do planejamento experimental do tipo Plackett–Burman, um novo planejamento fatorial 2^3 foi realizado e os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Pectinametilesterase (PME)

Verifica-se que a máxima atividade de pectinametilesterase (2,50 U/mL) foi obtida no ensaio 6, conforma Tabela 13, onde observa-se as maiores concentrações de pectina (22 g/L), extrato de levedura (20 g/L), L-Asparagina (4,0 g/L), fosfato de potássio (4,0 g/L) e sulfato de ferro - II (0,02 g/L). O tempo de bioprodução para a enzima PME foi fixado em 24 horas em função da máxima atividade verificada na cinética de bioprodução de PME (Tabela 46, Apêndice III).

A Figura 18 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas.

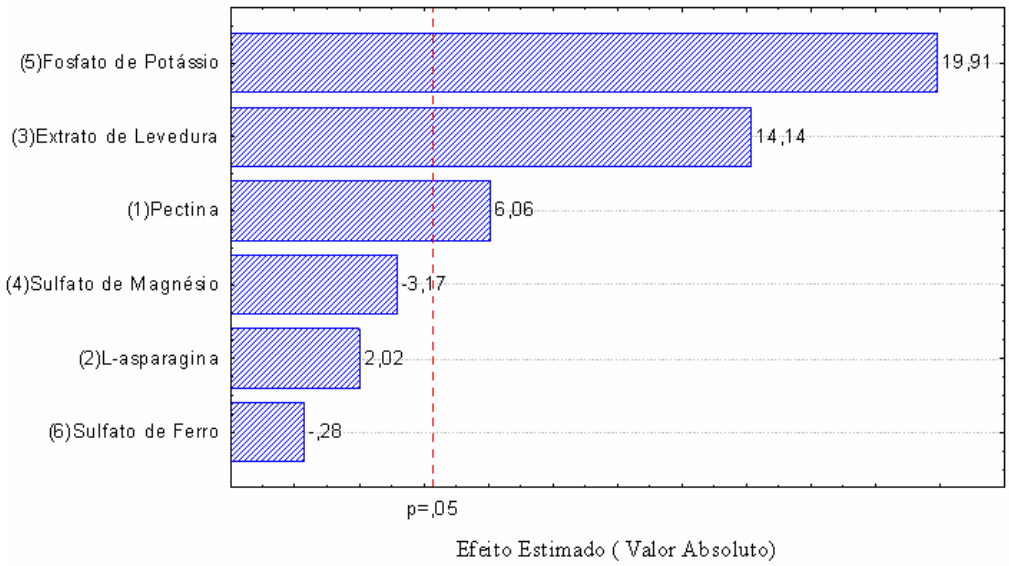


Figura 18- Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a produção de pectinametilesterase (U/mL).

Conforme a Figura 18, verifica-se que as concentrações de fosfato de potássio, extrato de levedura e pectina tiveram efeito significativo ($p<0,05$) positivo, demonstrando que se as concentrações e/ou faixas destas variáveis forem deslocadas para níveis superiores, possivelmente ocasionará um incremento na atividade enzimática. Entretanto, as variáveis sulfato de magnésio, L-asparagina e sulfato de ferro (II) não influenciaram significativamente ($p<0,05$), ou seja, como as concentrações no nível -1 era zero, as duas primeiras variáveis foram excluídas do processo e fixou-se a concentração de sulfato de ferro (II) em 0,02 g/L baseado na máxima atividade de PME obtida no ensaio 6. Com base nos resultados de bioprodução de PME demonstrados na análise do planejamento experimental do tipo Plackett–Burman, um novo planejamento fatorial 2^3 foi realizado e os resultados estão apresentados na Tabela 27.

Pectinesterase (PE) e Pectato liase (PGL)

Na Tabela 13 constam os resultados referentes as enzimas PE e PGL. As máximas atividades enzimáticas foram de 0,3599 e de 0,0843 U/mL, em 48 horas para a PE e PGL, respectivamente. O tempo de bioprodução para as enzimas PE e PGL foram fixados em 48 horas em função das máximas atividades verificadas nas cinéticas de bioprodução destas enzimas (Tabelas 47 e 48, Apêndices IV e V, respectivamente).

As atividades de PE e PGL nos extratos enzimáticos brutos produzidos por *Penicillium brasilianum* são consideradas baixas quando comparadas aos dados reportados em literatura, desta forma não justificando ensaios de maximização e/ou otimização da produção destas enzimas. Damak *et al.* (2011), em extrato enzimático de *Penicillium occitanis* a base de pectina cítrica, porém purificado, obtivaram atividade de PGL de 343 U/mL. Ouattara *et al.* (2011) na produção de pectato liase por cepas de *Bacillus,* obtiveram atividade igual a 22,632 U/mg pela cepa identificada como *Bacillus subtilis*, FJ483514, e atividade de pectato liase igual a 0,109 U/mg pela cepa *B. cereus* (DQ339685). Santi (2005) estudando a produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais verificou que quando o meio continha casca de laranja (1 %) ocorreu a maior produção de PE (0,87 U/mL) após 72 horas com agitação de 170 rpm e temperatura de 28ºC, seguida de pectina cítrica (0,78 U/mL) e casca de limão (0,68 U/mL). Assim como Lima (2006), no estudo da produção de pectinases por *Aspergillus tubingensis* LUC40F4C1 e classificação de suco de camu-camu com pectinesterases, obteve atividade de PE de 2,38 U/mL em 48 horas, a partir deste

período até 72 horas houve redução de 21,43 % da atividade de PE quando registrou 1,87 U/mL. No período subsequente (96 horas), PE aumentou cerca de 100 % (3,76 U/mL). As condições de cultivo foram: meio contendo 0,5 % de pectina cítrica, pH inicial 2,5, 30ºC, agitação de150 rpm e concentração de esporos de 10^6 esporos/mL.

4.2.4. Exo-poligalacturonase (exo-PG)

4.2.4.1. Produção da exo-poligalacturonase em frascos agitados

De acordo com os resultados obtidos com o planejamento experimental Plackett–Burman (Tabela 13), as faixas das variáveis foram ampliadas, sendo que a Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 e as respostas em atividade enzimática de exo-PG e pH. A máxima atividade de exo-PG foi encontrada no ensaio 1 (42,65 U/mL), não apresentando significativa diferença (p> 0,05%) dos obtidos nos ensaios 5, 6, 11 e os correspondentes aos do ponto central, caracterizando desta forma a maximização da produção de exo-poligalacturonase.

Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 completo (valores codificados e reais) e resposta em produção de exo-poligalacturonase e pH.

Ensaios	*Variáveis Independentes**			*Respostas*	
	X_1	X_3	X_4	*Exo-PG (U/mL)*	*pH*
1	-1 (22)	-1 (5)	-1 (0,2)	42,65	4,86
2	1 (42)	-1 (5)	-1 (0,2)	36,06	4,77
3	-1 (22)	1 (15)	-1 (0,2)	25,94	5,17
4	1 (42)	1 (15)	-1 (0,2)	29,08	5,02
5	-1 (22)	-1 (5)	1 (0,8)	40,61	4,87
6	1 (42)	-1 (5)	1 (0,8)	38,51	4,74
7	-1 (22)	1 (15)	1 (0,8)	29,84	5,18
8	1 (42)	1 (15)	1 (0,8)	24,14	5,03
9	-1,68 (15,2)	0 (10)	0 (0,5)	29,20	5,14
10	1,68 (48,8)	0 (10)	0 (0,5)	16,97	4,88
11	0 (32)	-1,68 (1,6)	0 (0,5)	41,73	4,51
12	0 (32)	1,68 (18,4)	0 (0,5)	14,87	5,11
13	0 (32)	0 (10)	-1,68 (0)	26,27	4,95
14	0 (32)	0 (10)	1,68 (1)	26,89	4,87
15	0 (32)	0 (10)	0 (0,5)	37,73	4,93
16	0 (32)	0 (10)	0 (0,5)	37,22	4,91
17	0 (32)	0 (10)	0 (0,5)	36,48	4,93

*X_1= Pectina (g/L), X_3= Extrato de levedura (g/L), X_4= Sulfato de magnésio (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, 24 horas e $pH_{inicial}$=5,5.

A Tabela 15 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da exo-poligalacturonase. As concentrações de pectina, extrato de levedura e sulfato de magnésio mostraram uma influência negativa ($p < 0,05$) sobre a atividade da exo-poligalacturonase. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 16).

Tabela 15 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de exo-poligalacturonase.

	Coeficientes de regressão	***Erro padrão***	***t(2)***	***p***
Média	36,61	0,36	100,62	0,0001
(1)Pectina (L)*	-2,33	0,17	-13,62	0,0053
Pectina (Q)*	-3,18	0,19	-16,90	0,0035
(2)Ex.Lev. (L)*	-6,89	0,17	-40,28	0,0006
Ex.Lev. (Q)*	-1,33	0,19	-7,08	0,0194
(3)$MgSO_4$ (L)	0,03	0,17	0,18	0,8767
$MgSO_4$ (Q)*	-1,94	0,19	-10,32	0,0093
1L.2L	0,77	0,22	3,44	0,0749
1L.3L	-0,54	0,22	-2,43	0,1355
2L.3L	-0,18	0,22	-0,81	0,5032

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

Tabela 16 - Análise de variância para a bioprodução de exo-PG do planejamento fatorial completo 2^3.

Fontes de variação	***Soma dos quadrados***	***Graus de liberdade***	***Quadrados médios***	***F calculado***
Regressão	848	5	169,53	7,02
Resíduo	266	11	24,14	
Falta de Ajuste	264,79	9		
Erro Puro	0,798	2		
Total	1113,23	16		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,87, $F_{tab,95\%}=3,20$

A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade da exo-poligalacturonase em função das variáveis analisadas (pectina, extrato de levedura e sulfato de magnésio), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 16), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,87 e o F calculado 2,19 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 19. O

coeficiente de correlação quantifica a qualidade do ajuste, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, variando de 0 a 100 % (Rodrigues & Iemma, 2005). O valor de F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado, ou seja, sempre que esta relação for maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4 (Barros, 1996).

Equação 4:

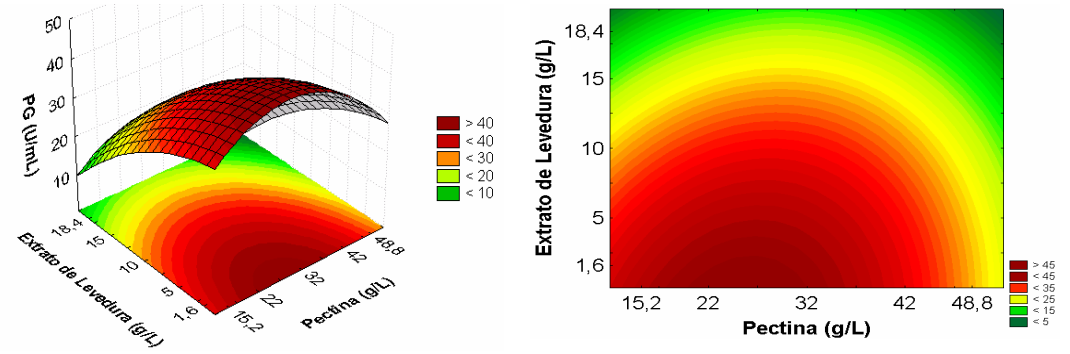
$$\text{Exo-PG} = 36{,}61 - 2{,}33X_1 - 3{,}18X_1^2 - 6{,}89X_3 - 1{,}33X_3^2 + 0{,}03X_4 - 1{,}94X_4^2 + 0{,}77X_1X_2 - 0{,}54X_1X_3 - 0{,}18X_2X_3 \quad (4)$$

Onde:

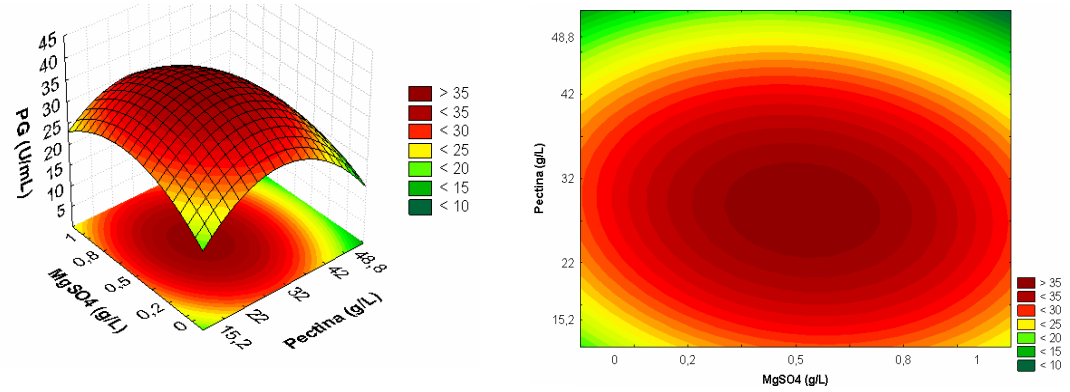
Exo-PG = Atividade de exo-PG (U/mL); X_1= Pectina (g/L); X_3= Extrato de levedura (g/L); X_4= Sulfato de magnésio (g/L)

A Figura 19 mostra a máxima produção de exo-PG (37,14 U/mL), encontrada na região próxima aos pontos centrais (pectina cítrica- 32 g/L, extrato de levedura- 10 g/L e sulfato de magnésio- 0,5 g/L), os quais caracterizam a maximização da bioprodução, dentro da faixa estudada.

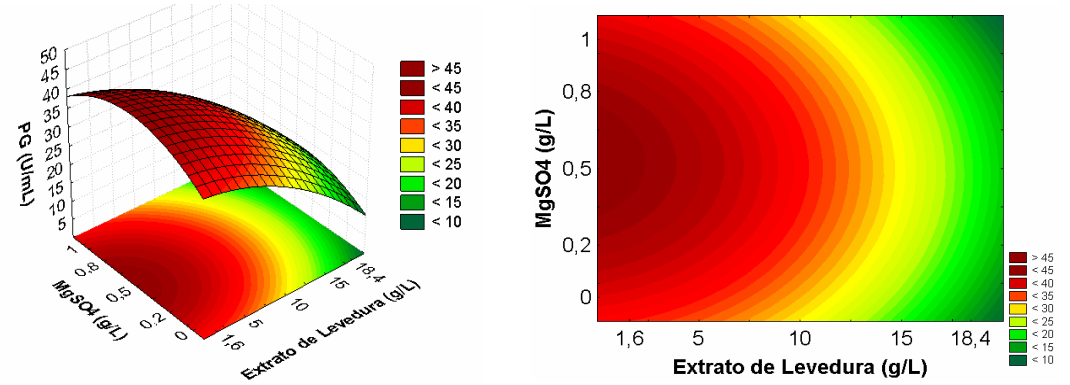
Existem poucos trabalhos na literatura que relatam os efeitos dos meios de cultura na otimização da atividade de poligalacturonases em fermentação submersa. Pandey *et al.* (1999) afirmam que a presença de pectina no meio, além do efeito indutivo, favorece a excreção de pectinases pelos fungos produtores. Tari *et al.* (2007) obtiveram atividade de poligalacturonase por *Aspergillus sojae* ATCC 20235, sendo que as concentrações de maltodextrina e água de maceração de milho e a velocidade de agitação, foram significativamente ($p<0,05$) positivas sobre a atividade enzimática (13,5 U/mL), nas concentrações de 120 g/L de maltodextrina, 350 rpm e 2×10^7 esporos totais.



(a)



(b)



(c)

Figura 19 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para bioprodução de exo-PG (U/mL) em função da concentração de extrato de levedura e pectina (a), concentração de pectina e sulfato de magnésio (b) e concentração de sulfato de magnésio e extrato de levedura (c).

4.2.4.2. Estudo cinético da bioprodução de exo-poligalacturonase (exo-PG)

O estudo cinético (Figuras 20 a e b) foi realizado a partir das condições experimentais otimizadas da bioprodução de exo-PG em frascos agitados (32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, e nas condições de 30°C, 180 rpm e $pH_{inicial}$ 5,5), tendo como objetivo avaliar a atividade de exo-poligalacturonase, o consumo de substratos, crescimento celular e o pH em função do tempo. Observa-se (Figura 20a) que a atividade máxima (52,79 U/mL) foi obtida em 48 horas de incubação da cultura, cabendo salientar que a maior produção de exo-PG está relacionada a fase exponencial de crescimento do micro-organismo.

O pH do meio de fermentação (Figura 20a) apresentou um leve declínio nas primeiras 36 horas (5,1 a 4,6) e a partir de 48 horas o valor do pH volta a aumentar. A razão dessa redução do pH pode ser explicada pela liberação de ácido galacturônico no meio pela ação de enzimas pectinolíticas (Uenojo & Pastore, 2007) produzidas pelo *P. brasilianum* durante as primeiras horas de fermentação (48 horas) e após este período, o aumento de pH deve-se, principalmente, ao consumo da fonte de nitrogênio disponível no meio, o qual corresponde ao consumo de aproximadamente 52 %. Segundo Ming Chu (1992), a acidificação ou alcalinização do meio de cultura reflete o consumo de substrato, estando relacionados aos íons amônio, o meio torna-se mais ácido e, quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino.

O pH é considerado um importante parâmetro envolvido na produção e manutenção de pectinases, pois alterações nos valores de pH podem influenciar a atividade enzimática por meio de modificações conformacionais na molécula, proporcionando assim alterações no seu sítio ativo, resultando na redução ou no aumento da sua afinidade com o substrato (Garzón & Hours, 1992). Geocze (1994) também sugere que uma das razões pela qual a produção e atividade de enzimas pécticas variam com o pH, também está relacionada com a estabilidade do pH de cada enzima pectinolítica.

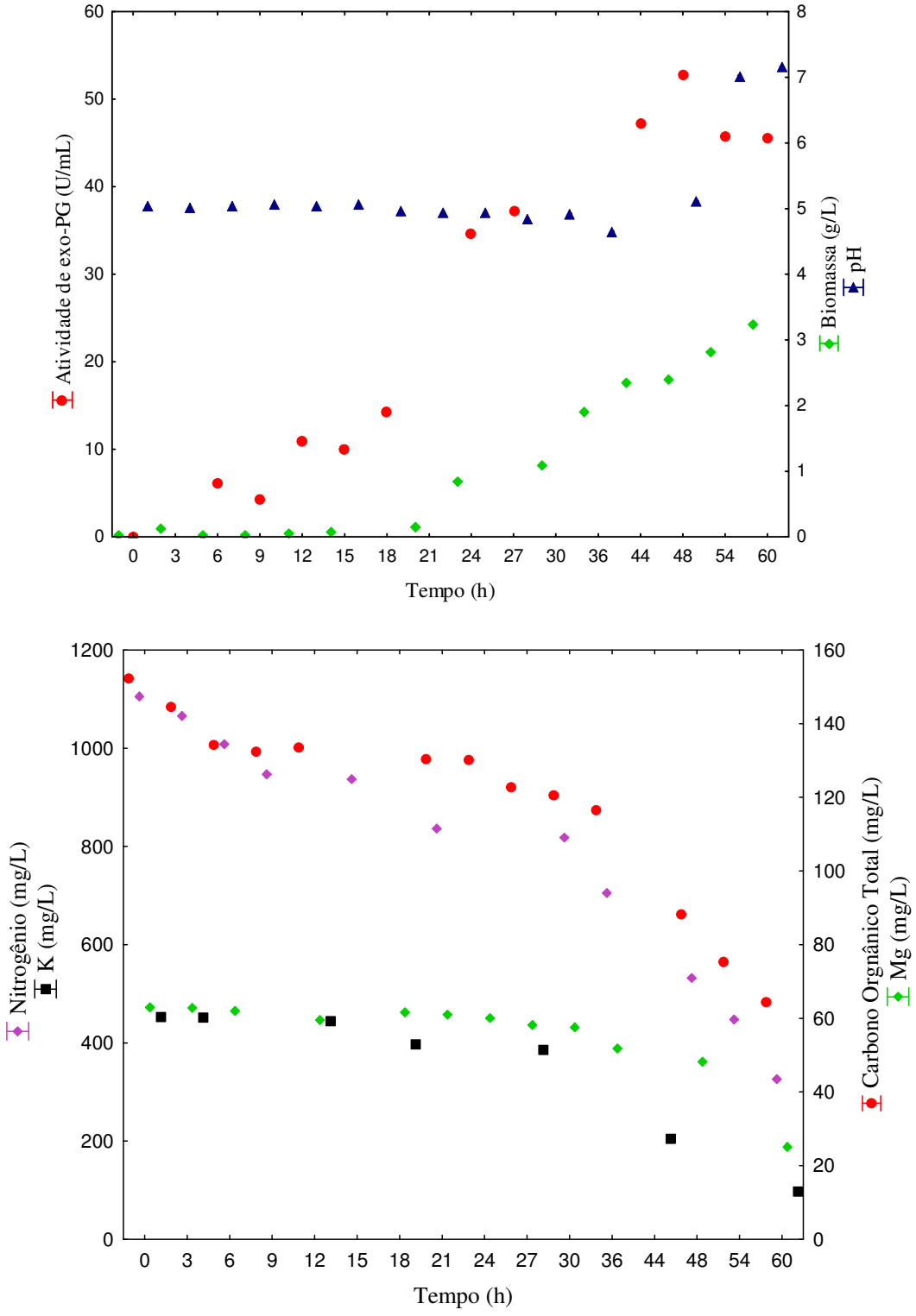


Figura 20 - Estudo cinético da bioprodução de exo-PG em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L) e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono, nitrogênio e minerais pelo tempo (horas) (b).

Ao analisar o consumo dos substratos (Figura 20b), observa-se que em relação ao carbono orgânico total, houve um decréscimo nas primeiras 6 horas de bioprodução (152,6 a 134 mg/L), mantendo-se praticamente constante até 24 horas e após este período reduz progressivamente, sendo que em 48 horas, ocorre a máxima produção de exo-PG, a concentração de carbono orgânico total é cerca de 88 mg/L (consumo de 42 % do COT). O consumo de potássio foi lento, porém gradativo, nas primeiras 27 horas (453 a 385 mg/L), reduzindo consideravelmente os teores de potássio após este período, com diminuição de aproximadamente 78 % em 60 horas. Comportamento similar foi verificado nas primeiras 30 horas para os teores de magnésio, onde a redução foi de 10 % e em 48 horas, correspondendo a maior bioprodução de exo-PG, com um consumo de 23 %.

Comparando os resultados da atividade de exo-poligalacturonase obtida a partir do fungo filamentoso *P. brasilianum*, com outras cepas de *Penicillium* sp. é possível verificar que as atividades enzimáticas, apresentadas neste trabalho, são superiores aos relatados na literatura. No trabalho de Silva *et al.* (2005) a produção de endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase avaliadas por fermentação em estado sólido de uma mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1, a 28ºC) com o fungo filamentoso *Penicillium viridicatum* RFC3 a atividade máxima de Exo-PG em 336 horas, com umidade inicial de 70 e 80 % de 5,8 e 8,9 U/mL, respectivamente. No entanto, ao utilizar um micro-organismo mutante *Penicillium occitanis* (CT1), Hadj-taieb *et al.* (2002), verificaram que este apresentou uma maior capacidade de secreção de endo-poligalacturonase (221 U/mL) e exo- poligalacturonase (86 U/mL), em comparação a cepa mãe (6,5 e 1,12 U/mL, respectivamente).

Empregando outros micro-organismos, Kashyap *et al*. (2000) obtiveram atividade de poligalacturonase (53 U/mL) com *Bacillus* sp. em 24 horas de bioprodução. Botella *et al.* (2007) ao utilizar o *Aspergillus awamori,* a produção de PG em fermentação submersa foi de 40 U/mL em 48 horas. Enquanto que Terzi *et al*. (2003) para a produção de PG por *Aspergillus niger* 3T5B8 obteve uma atividade de 33 U/mL em 64 horas de bioprodução em fermentação submersa. Fontana *et al.* (2005) estudando a produção de poligalacturonase por *Arpergillus niger* em meio sólido constaram a maior atividade de endo-PG (140,0 U/g), quando adicionado pectina cítrica a base de farelo de trigo, até o limite de 16 % (m/m), o qual afetou positivamente o crescimento de *A. niger*, reprimindo, entretanto, a formação de exo-PG. Zheng & Shetty (2000) utilizaram resíduos de indústrias de processamento de frutas (morango e maçã)

para a produção de poligalacturonase em fermentação de estado sólido por *Lentinus edodes*, sendo que a atividade enzimática máxima (29,4 U/g) foi no meio contendo polpa de morango seguida pela atividade do meio de maçã (20,1 U/g), ambas à 50ºC e pH 5,0.

4.2.4.3. Produção da exo-poligalacturonase em biorreator

A Tabela 17 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e respostas em produção de exo-poligalacturonase (exo-PG) em biorreator e valores de pH após 36 horas de bioprodução.

Tabela 17 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em produção de exo-poligalacturonase e pH em biorreator.

Ensaios	**Variáveis Independentes*		*Respostas*	
	X_1 (rpm)	***X_2 (vvm)***	***Exo-PG (U/mL)***	***pH***
1	-1 (241)	-1 (0,8)	44,56	4,51
2	1 (539)	-1 (0,8)	34,31	4,56
3	-1 (241)	1 (2,2)	31,30	4,6
4	1 (539)	1 (2,2)	30,27	4,55
5	-1,41 (180)	0 (1,5)	53,87	4,48
6	1,41 (600)	0 (1,5)	20,74	5,02
7	0 (390)	-1,41 (0,5)	31,61	4,23
8	0 (390)	1,41 (2,5)	45,58	4,58
9	0 (390)	0 (1,5)	38,47	4,19
10	0 (390)	0 (1,5)	39,56	4,66
11	0 (390)	0 (1,5)	35,08	4,49

*X_1= agitação (rpm); X_2= aeração (vvm). Variáveis fixas: 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio; 30 °C, pH 5,5 e 36 horas.

Verifica-se que a máxima atividade de exo-poligalacturonase foi de 53,87 U/mL (Ensaio 5) com 180 rpm, taxa de aeração de 1,5 vvm, 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, empregando uma concentração de esporos de $5x10^6$ esporos/mL a 30°C e inicial pH 5,5. Este comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 21 que mostra a cinética de bioprodução dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^2, onde a máxima atividade foi observada no ensaio 5 com 36 horas de bioprodução. Em todos os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado o monitoramento do pH (Tabela 49, Apêndice VI) onde observou-se uma pequena variação de pH_{final} ao comparar com o $pH_{inicial}$ do meio de bioprodução de 5,5.

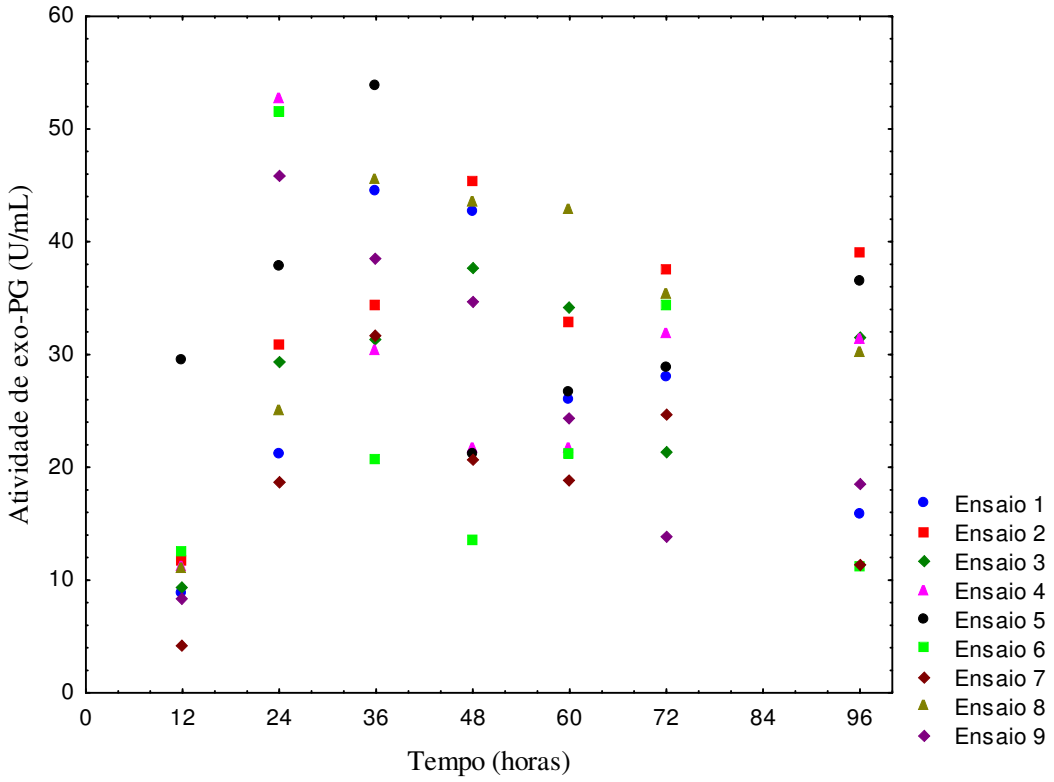


Figura 21 – Estudo cinético da atividade de exo-poligalacturonase em todos os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 em biorreator.

A Figura 22 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a atividade de exo-PG, onde observa-se que a variável agitação apresentou efeito significativo negativo ($p<0,05$) sobre a produção de atividade da exo-poligalacturonase, indicando que possivelmente a diminuição da agitação ocasionaria um incremento na atividade exo-poligalacturonásica. Neste sentido, um experimento (em triplicata) foi conduzido com as condições fixas de agitação de 100 rpm e aeração de 1,5 vvm. Nestas condições não foi verificado um aumento na produção de exo-poligalacturonase (35,04 U/mL), demonstrando que a maximização da produção de exo-PG em biorreator foi de 53,87 U/mL (Ensaio 5 – Tabela 17) a 180 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm. Com uma concentração de esporos de $5x10^6$esporos/mL a 30°C, $pH_{inicial}$ 5,5 e meio de cultivo composto de 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio e durante 36 horas de produção.

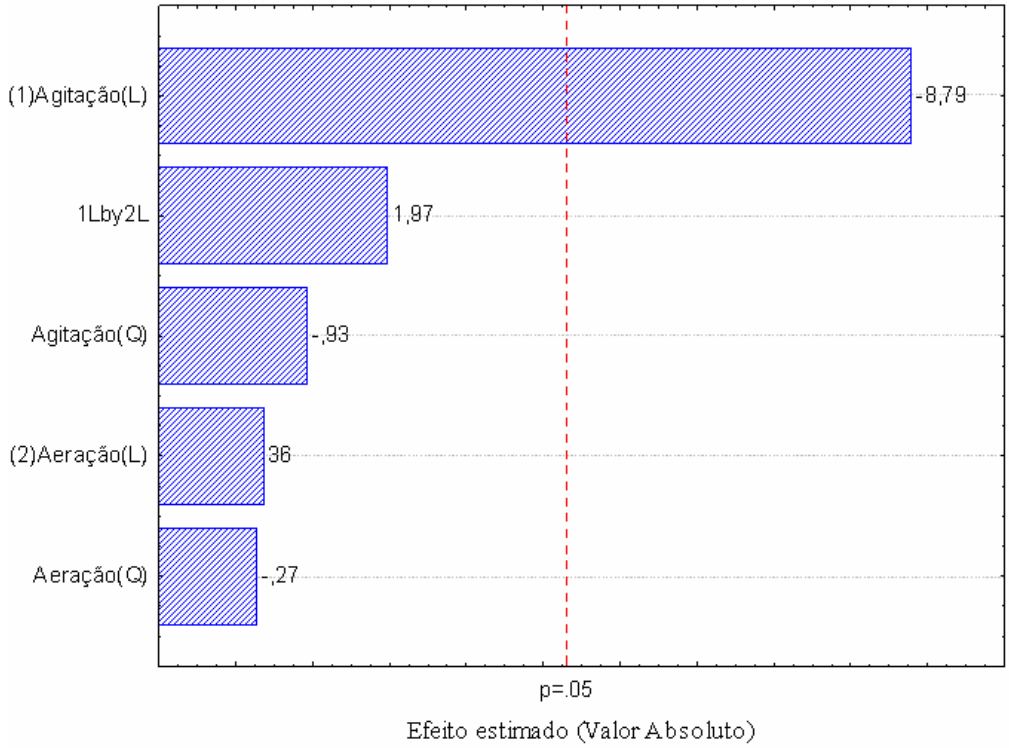


Figura 22 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial completo 2^2, para a produção de exo-poligalacturonase (U/mL) em biorreator.

A Figura 23 apresenta aspectos do meio de bioprodução após 24, 48 e 96 horas. É possível que a frequência de agitação do meio tenha influenciado a multiplicação e a morfologia do micro-organismo, afetando as características reológicas e, consequentemente a produção de enzimas. O mesmo foi observado Márquez-Rocha *et al.* (1999) onde o aumento de agitação ocasionou uma diminuição do tamanho dos *pellets* e a velocidade específica de crescimento *Pleurotus ostreatus* ECS- 0110 (IE8). Por sua vez, Treskatis *et al.* (1997) e Rossi *et al.* (2002) afirmam que o controle da morfologia e do tamanho dos *pellets* é importante para o aumento da produção enzimática dos fungos filamentosos em meio líquido, a fim de evitar a limitação de oxigênio no interior dos *pellets*, e consequentemente, a autólise da células. Em contrapartida, já foi demonstrado por Baley & Pessa (1990) que em cultivos de fungos filamentosos com altas frequências de agitação, pode provocar a ruptura do micélio, tendo Justen *et al.* (1996) sugerido que deve haver um balanço entre o efeito da agitação e a fragmentação do micélio.

(a) **(b)** **(c)**

Figura 23 - Aspecto do cultivo do *Penicillium brasilianum* em biorreator após 24 horas (a), 48 horas (b) e 96 horas (c) de bioprodução de exo-PG.

Na literaura, os estudos realizados em biorreator demonstraram diferentes atividades, comparadas as encontradas neste trabalho. Fontana *et al.* (2009) estudaram a produção de endo e exo-poligalacturonase (PG) por *Aspergillus oryzae* IPT 301, em meio contendo farelo de trigo suspenso, em um biorreator de tanque agitado (STR) e de um biorreator airlift de circulação interna. Em ensaios a partir das 96 horas, os valores máximos de atividade enzimática obtidos para endo e exo-PG foram 65,2 U/mL e 91,3 U/mL em biorreator STR, com valores de atividade similar de 60,6 U/mL e 86,2 U/mL, respectivamente, sendo realizados no biorreator airlift. O biorreator airlift também apresentou resultados satisfatórios quanto à taxa de transferência de oxigênio nesse processo, indicando seu potencial para ser usado em uma eventual produção em maior escala de exo e endo-PG, com menores custos para a instalação e operação. Sandri (2010) avaliou a influência do pH inicial do meio sobre a produção de PGs em biorreator pelo micro-organismo *Aspergillus fumigatus* LB39J e constatou as maiores atividades de endo-PG de 42 U/mL e exo-PG 37 U/mL em pH inicial de 4,0.

4.2.4.4. Caracterização parcial da exo-poligalacturonase (exo-PG)

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 em frascos agitados procedeu-se a caracterização parcial da enzima exo-poligalacturonase.

Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium brasilianum* em frascos agitados, nas condições otimizadas de bioprodução (pectina cítrica -32 g/L, extrato de levedura -10 g/L, sulfato de magnésio -0,5 g/L, pH - 5,5, 180 rpm, 30°C, 48 horas e $5x10^6$esporos/mL), foram definidos baseados em um planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais) conforme descrito na Tabela 28.

Tabela 18 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade exo-poligalacturonásica em função de temperatura e pH ótimos.

Ensaios	****Variáveis Independentes***		***Poligalacturonase***
	pH	***Temperatura (°C)***	***(U/mL)***
1	-1 (3,4)	-1 (37)	5,35
2	1 (5,5)	-1 (37)	45,68
3	-1 (3,4)	1 (73)	17,79
4	1 (5,5)	1 (73)	14,42
5	-1,41 (3)	0 (55)	7,88
6	1,41 (6)	0 (55)	43,14
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	40,96
8	0 (4,5)	1,41 (80)	35,38
9	0 (4,5)	0 (55)	39,79
10	0 (4,5)	0 (55)	40,24
11	0 (4,5)	0 (55)	39,85

A partir dos resultados apresentados no planejamento fatorial completo 2^2 para as variáveis de pH e temperatura (Tabela 18), no ensaio 2 foi observado a maior atividade com valor de 45,68 U/mL.

A Tabela 19 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da exo-poligalacturonase a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que a temperatura apresentou efeito significativo negativo.

A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PG em função das variáveis analisadas (Temperatura e pH), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 20) onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,94 e o F calculado 2,33 vezes maior que o

valor tabelado, o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e/ou curva de contorno apresentadas na Figura 24.

Tabela 19 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de exo-poligalacturonase em função de temperatura e pH ótimos.

	Coeficiente de Regressão	*Erro padrão*	*t(2)*	*p*
Média	40,00	0,14	284,00	0,000012
(1)pH (L)*	10,87	0,09	125,78	0,000063
pH (Q)*	-10,05	0,10	-97,51	0,000105
(2)Temperatura(L)*	-3,35	0,09	-38,74	0,000666
Temperatura(Q)*	-3,68	0,10	-35,73	0,000782
1L.2L*	-10,92	0,12	-89,55	0,000125

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 20 - Análise de variância para a atividade de exo-PG do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.

Fontes de variação	*Soma dos quadrados*	*Graus de liberdade*	*Quadrados médios*	*F calculado*
Regressão	1912,36	3	637,45	10,11
Resíduo	441,17	7	63,02	
Falta de Ajuste	441,05	5		
Erro Puro	0,12	2		
Total	2353,53	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{tab} = 4,25$

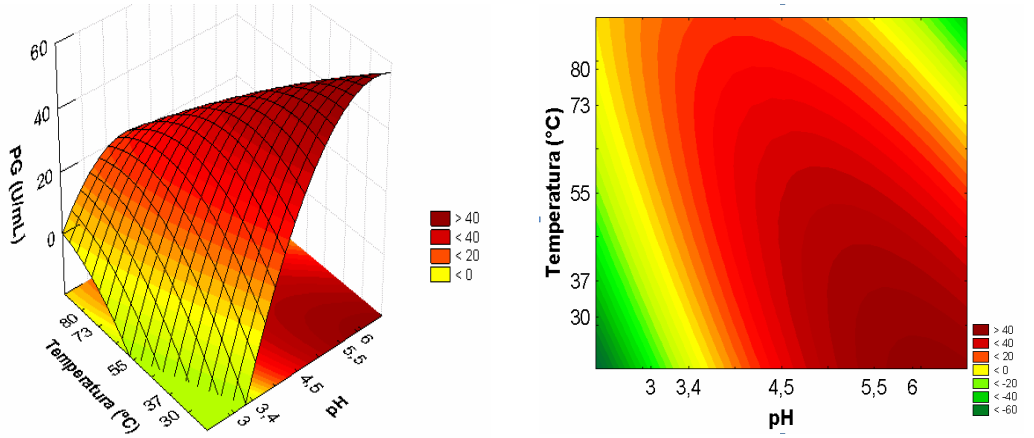
Equação 5:

$$\text{Atividade de exo-PG (U/mL)} = 40,00 + 10,87.pH - 10,05.(pH)^2 - 3,35.T - 3,68.(T)^2 - 10,92.(pH).(T) \quad (5)$$

Onde:

Exo-PG = Atividade de exo-poligalacturonase (U/mL);

T = Temperatura (ºC).



(a) (b)

Figura 24 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de exo-PG (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH.

A partir da determinação dos valores de temperatura (°C) e pH ótimos do extrato enzimático bruto, estabeleceu-se que o pH ótimo é na faixa de 4,5 a 7 e a temperatura ótima na faixa de 30 a 40°C.

Na literatura consultada, observa-se que as temperaturas e pH ótimos, variam em função das condições de cultivo e/ou do extrato enzimático e da cepa utilizada. Silva *et al.* (2007), estudando enzimas pectinolíticas (exo-poligalacturonases) produzidas por *Penicillium viridicatum* RFC3, obteve melhores resultados em pH 6,0 e 60°C. Cordeiro & Martins (2009), na produção de poligalacturonase pelo termofílico *Bacillus* sp., cultivado em meio líquido contendo pectina cítrica como única fonte de carbono, definiu a temperatura e o pH ótimos para a atividade da poligalacturonase sendo 70°C e 7,0, respectivamente. Quiroga *et al.* (2009) em estudos com a enzima exo-poligalacturonase produzido pelo *Pycnoporus sanguineus* obteve pH ótimo de 4,8 e temperatura ótima na faixa de 50 a 60°C. Ortega *et al.* (2004) e Carvalho (2007) verificaram que pH ótimo, para determinação de atividade de PG, foi de 4,5 e em enzimas comerciais Pectinex 3XL, Rapidase C80 e a pectinase CCM verificaram que o pH ótimo foi de 4,7, 4,0 e 4,0, respectivamente. Mohamed *et al.* (2006) descrevem que o pH ótimo foi de 5,0 para atividade poligalacturonásica produzida por *Trichoderma harzianum.* O mesmo foi verificado ao utilizar a levedura *Kluyveromyces wickerhamii* (Moyo *et al*., 2003) e os fungos filamentosos *Aspergillus niger* (Behere *et al.,* 1993) e *Fusarium moniliforme* (Niture & Pant, 2004).

Martins *et al*. (2004) observaram atividade máxima de PG por *Moniliella* sp em pH 4,5. Para *Penicillum* sp EGC5 o pH ótimo foi de 9,0. Para cepas identificadas de *Penicillum* deste trabalho pode-se observar esta tendência, onde o *P. duclauxii* ATCC 9121 e *P. digitatum* ATCC 26821 apresentaram atividade máxima de PG (0,56 e 0,95 U/mL) em pH próximo de 9,0. 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.

Kashyap *et al*. (2000) estudaram o efeito do pH e da temperatura sobre o crecimento microbiano demostrando que a máxima produção de pectinases foi ao redor do pH 7,2 e a 37°C houve a maior produção de enzimas. Martins *et al.* (2007), estudaram a poligalacturonase extracelular do micro-organismo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756, e verificaram que a enzima foi ativa em pH 5,5 e 60-65°C. Tari *et al.* (2008) na caracterização da enzima exo-poligalacturonase produzido pelo *Aspergillus sojae* observou temperatura ótima de 55 °C. Vários autores relatam que a temperatura ótima de poligalacturonase encontra-se na faixa de 40 e 50°C, para as cepas de *Aspergillus niger* (Kashyap *et al.,* 2000), *Kluyveromyces wickerhamii* (Moyo *et al.,* 2003), *Trichoderma harzianum* (Mohamed *et al*., 2006), *Bacillus* sp. (Kobayashi *et al.,* 2001), *Mucor flaves* (Grade *et al*., 2003) e *T. reesei* (Mohamed *et al*., 2003).

Estabilidade do extrato enzimático bruto a altas temperaturas

O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é mantida ao longo do armazenamento. Os resultados da estabilidade a altas temperaturas do extrato enzimático bruto da exo-PG estão apresentados na Figura 25.

De acordo com a Figura 25, verifica-se que até as 55 horas o extrato enzimático bruto apresentou comportamento semelhante em todas as temperaturas, sendo que a maior estabilidade encontra-se na temperatura de 55°C, onde observa-se que a atividade residual manteve-se com 80 % por aproximadamente 558 horas.

Quando comparados estes resultados com os citados na literatura, a enzima exo-PG produzida por *Penicillium brasilianum*, utilizando pectina cítrica comercial como substrato demonstrou estabilidade térmica elevada. Assis *et al.* (2004), estimaram que a maioria das pectinases encontram-se ativa por maior tempo no intervalo de temperatura entre 40 e 50°C. Carvalho (2007), ao realizar testes de estabilidade térmica, a fim de caracterizar três enzimas comerciais denominadas Pectinase CCM, Rapidase C80 e

Pectinex 3XL, obteve ao final de 1 hora de incubação a 50°C apenas 57, 5 e 10 % das atividades iniciais de PG, respectivamente.

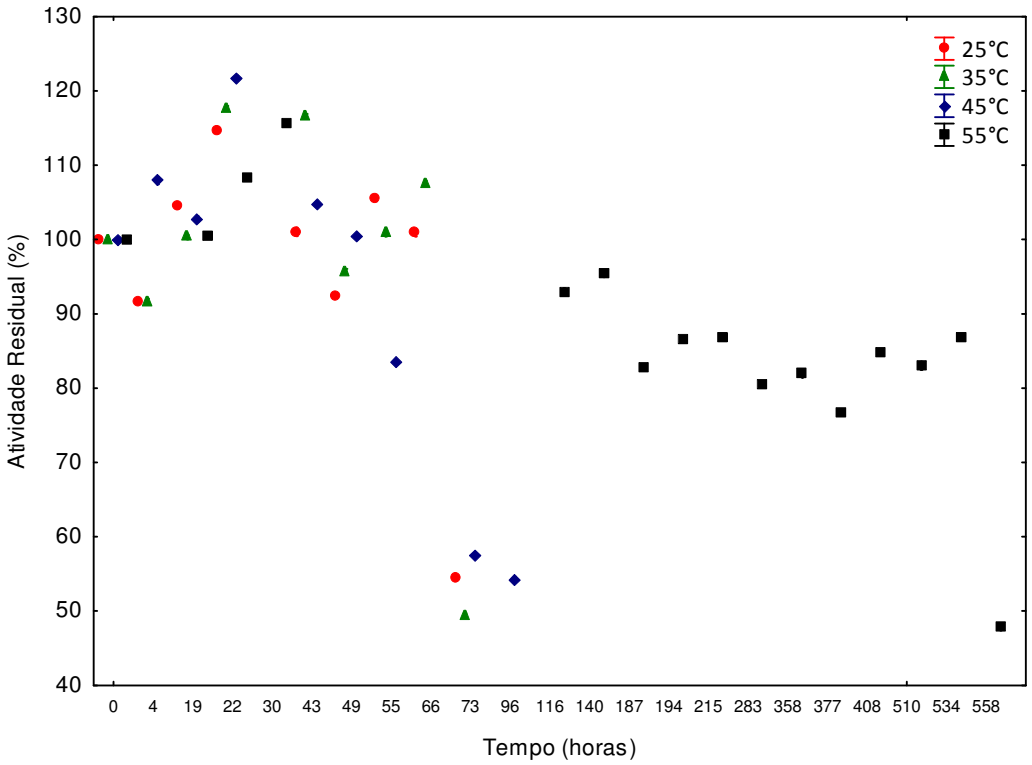


Figura 25 – Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG submetido a temperaturas de 25, 35, 45 e 55°C.

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.

A partir dos dados obtidos experimentalmente foram plotados como ln (A/A0) como uma função do tempo. Após este procedimento, a constante de desativação térmica (Kd) foi obtida em cada temperatura e apresentada na Tabela 21. Um gráfico de ln (Kd) em função de 1/T (K) foi utilizada para calcular a energia de ativação (Ed) para a reação de desativação. A energia de ativação foi de 5,76 kJ/mol, o qual apresentou um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 693,10 horas para a temperatura de 55°C.

Tabela 21 - Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da exo-PG obtido pelo *P. brasilianum.*

Temperatura (°C)	***K (h^{-1})***	***$t_{1/2}$ (h)***
25	0,002	346,55
35	0,003	231,03
45	0,008	86,64
55	0,001	693,10

Assim, estes resultados sugerem uma boa aplicabilidade industrial desta enzima sob temperaturas relativamente altas, como na indústria de doces, xaropes, sucos e bebidas.

Tari *et al.* (2008) observaram que o tempo de meia-vida da poligalacturonase de *Aspergillus sojae* a 75°C foi de 2,25; 4,97 e 3,53 vezes maior do que os valores de tempo de meia-vida nas temperaturas de 80, 82,5 e 85°C, respectivamente. Os autores afirmam que a estabilidade térmica desta enzima é a 75°C e a partir desta temperatura a mesma é inativada, sendo a energia de inativação do extrato bruto de poligalacturonase de 152 KJ/mol. Shusler & Kargi (2002) observaram valores de 167-293 KJ/mol para muitas enzimas microbianas. A energia estimada para inativação destas enzimas foram de 1,05; 0,92 e 0,96 vezes maior que a poligalacturonases comerciais Rapidase C80, Pectinase CCM e Pectinex 3 XL, respectivamente (Ortega *el al*., 2004).

Estabilidade do extrato enzimático bruto a baixas temperaturas

O extrato enzimático bruto obtido a partir de *Penicillium brasilianum* foi armazenado a 4, -10 e -80°C. De acordo com os resultados apresentados na Figura 26, verifica-se que o extrato obtido a partir de *Penicillium brasilianum* quando armazenado a -80°C apresentou atividade residual de aproximadamente 50% no período de 39 dias de armazenamento, o extrato enzimático armazenado a -10ºC teve comportamento semelhante com atividade residual acima de 50% durante 35 dias, podendo o extrato ser armazenado a -10°C visando a diminuição de gastos com o armazanamento.

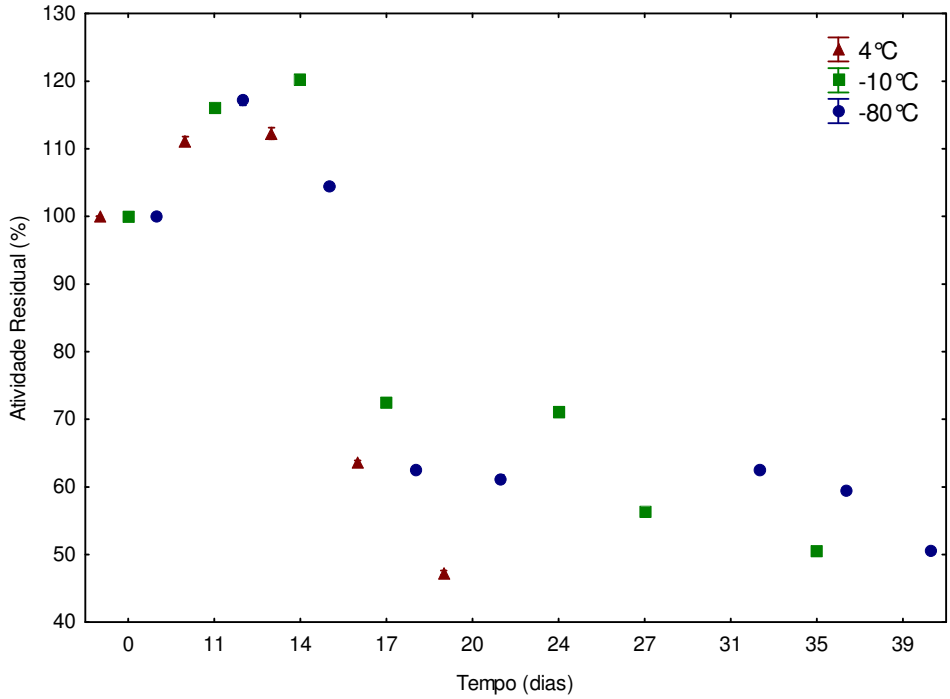


Figura 26 - Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG armazenado a 4, -10 e -80°C.

Avaliação do extrato enzimático quanto a estabilidade ao pH

O comportamento da estabilidade do extrato enzimático bruto avaliado a diferentes pH de 4, 5, 6, 7 e 9 à 40°C encontram-se na Figura 27. A maior atividade residual foi obtida em pH 5,0, com 40% da sua atividade inicial por um período de aproximadamente 210 horas. Com esta faixa de pH, esta enzima apresenta aplicações promissora em processos industriais. No entanto, o pH 7 e 6 mantiveram atividade residual de 50 % até 40 e 6,5 horas, respectivamente. Sendo desta forma os pH 7 e 6 os menos indicado para aplicações industriais.

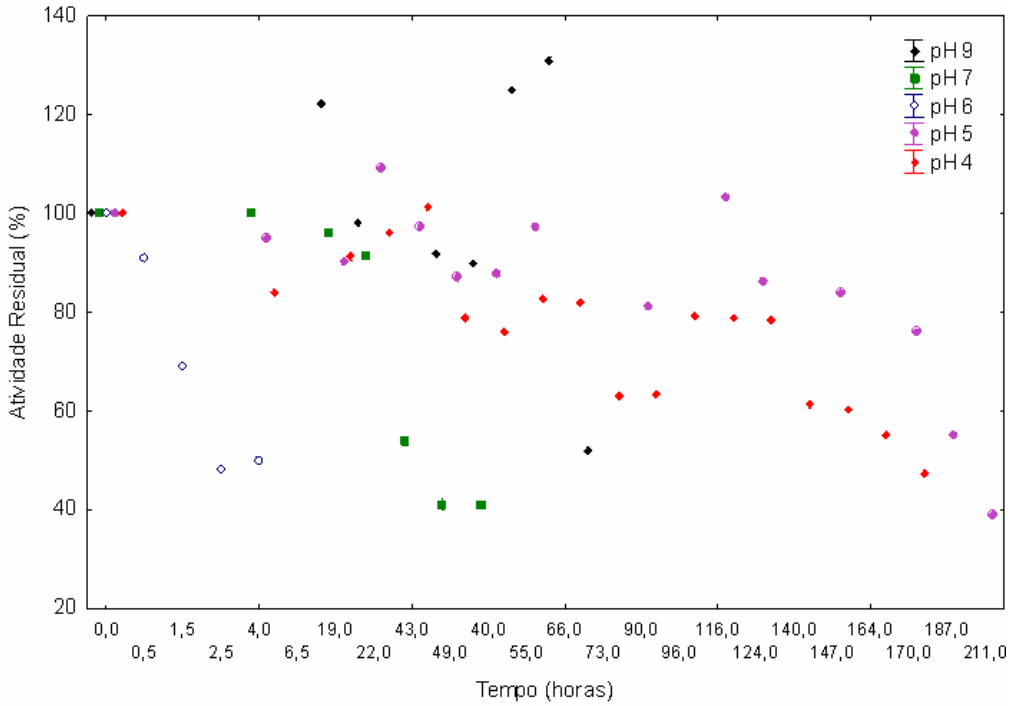


Figura 27 – Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG submetidos a valores de pH de 4, 5, 6, 7 e 9 a 40°C.

Corroborando com os resultados obtidos por Grade *et al.* (2003) que obtiveram a enzima PG de *Mucor flavus* completamente estável entre pH 2,5 e 6,0 por 20 horas a 20ºC, mas em pH 7,0, a estabilidade diminuiu para 60 %. Este comportamento também foi verificado por Martins *et al.* (2007) que estudaram a poligalacturonase extracelular do micro-organismo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756, e verificaram que a PG foi estável em pH 5,0 a 5,5. Por outro lado, Hoondal (2002) descreve uma poligalacturonase produzida por *A. fumigatus* estável numa faixa de pH de 3 a 9. Kobayashi *et al.* (2001) relataram que PG de *Bacillus* sp. foi muito estável pH entre 6 e 12, quando incubados a 30ºC por 1 hora.

Martins *et al.* (2005) também utilizaram fermentação submersa para caracterizar uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus*, onde investigaram a estabilidade térmica e estabilidade frente às variações do pH e onbervaram que em pH 3,0 – 3,5 a poligacturonase manteve, cerca de 91% da atividade original. Em valores de pH elevados houve uma queda na estabilidade. Souza *et al.* (2010) através de fermentação em estado sólido estudaram a caracterização da enzima poligalacturonase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*, onde o extrato enzimático bruto

possuiu boa estabilidade térmica até temperaturas de 50°C, e a enzima permaneceu estável para pH entre 3,5 e 5,5.

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 (KH_2PO_4) e o micro-organismo *Aspergillus niger* como agente da fermentação. Neste trabalho foi determinada a taxa de desativação das enzimas polimetilgalacturonases (PMG), exo-poligacturonase (exo-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.

Naidu & Panda (2003) demonstraram que enzimas pectinolíticas presentes no extrato bruto são mais estáveis que enzimas parcialmente purificadas, fato este devido à interação entre outras enzimas e proteínas secretadas pelos micro-organismos no meio e/ou combinação dessas hipóteses. Tari *et al.* (2008) concordam que a poligalacturonase presente no extrato bruto é mais estável do que a enzima purificada e ressaltam, ainda, que caracterizando-se a amostra bruta, percebe-se a ação colaborativa de diferentes enzimas pectinolíticas, pode aumentar o rendimento do processo de extração ou clarificação na indústria de sucos de frutas.

4.2.5. Pectina liase (PMGL)

4.2.5.1. Produção de pectina liase em frascos agitados

De acordo com os resultados obtidos com o planejamento experimental Plackett–Burman (Tabela 13), as faixas das variáveis foram ampliadas, sendo que um novo planejamento foi realizado e a matriz do planejamento fatorial 2^3 e suas respectivas respostas em atividade enzimática de PMGL e pH encontram-se descritas na Tabela 22.

Os resultados apresentados na Tabela 22, demonstram que a máxima atividade de PMGL foi de 7,07 U/mL (Ensaio 4), com meio de cultivo composto por 33 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio nas condições de 180 rpm, 30°C, 48 horas e $pH_{inicial}$ 5,5.

Tabela 22 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resposta em produção de pectina liase (U/mL) e pH.

Ensaios	*Variáveis Independentes**			*Respostas*	
	X_1	X_3	X_5	*PMGL (U/mL)*	*pH*
1	-1 (11)	-1 (10)	-1 (2)	6,08	5,51
2	1 (33)	-1 (10)	-1 (2)	6,86	4,8
3	-1 (11)	1 (30)	-1 (2)	4,61	5,59
4	1 (33)	1 (30)	-1 (2)	7,07	4,89
5	-1 (11)	-1 (10)	1 (6)	2,75	5,02
6	1 (33)	-1 (10)	1 (6)	6,01	5,42
7	-1 (11)	1 (30)	1 (6)	3,48	5,47
8	1 (33)	1 (30)	1 (6)	6,53	4,92
9	0 (22)	0 (20)	0 (4)	6,36	4,92
10	0 (22)	0 (20)	0 (4)	5,54	4,89
11	0 (22)	0 (20)	0 (4)	6,28	4,91

*X_1= Pectina (g/L), X_3= Extrato de levedura (g/L), X_5= Fosfato de potássio (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, 48 horas e $pH_{inicial}$=5,5.

A Tabela 23 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da PMGL a nível de confiança de 95 %. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância ANOVA (Tabela 24).

Tabela 23 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2^2 para atividade de pectina liase.

	Coeficiente de Regressão	*Erro padrão*	*t(2)*	*p*
Média	5,862	0,228	25,750	0,00151
(1) Pectina (L)*	1,195	0,267	4,477	0,04645
(2) Extrato de Levedura (L)	-0,003	0,267	-0,012	0,99117
(3) Fosfato de K (L)	-0,731	0,267	-2,738	0,11153
1L.2L	0,183	0,267	0,687	0,56314
1L.3L	0,384	0,267	1,439	0,28673
2L.3L	0,314	0,267	1,177	0,36032

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

Tabela 24 - Análise de variância para a atividade de pectina liase do planejamento fatorial 2^2.

Fontes de variação	*Soma dos quadrados*	*Graus de liberdade*	*Quadrados médios*	*F calculado*
Regressão	11,42	1	11,42	7,48
Resíduo	13,74	9	1,53	
Falta de Ajuste	12,59702	7		
Erro Puro	1,14005	2		
Total	25,16127	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,95 , $F_{tab.}$ = 5,11

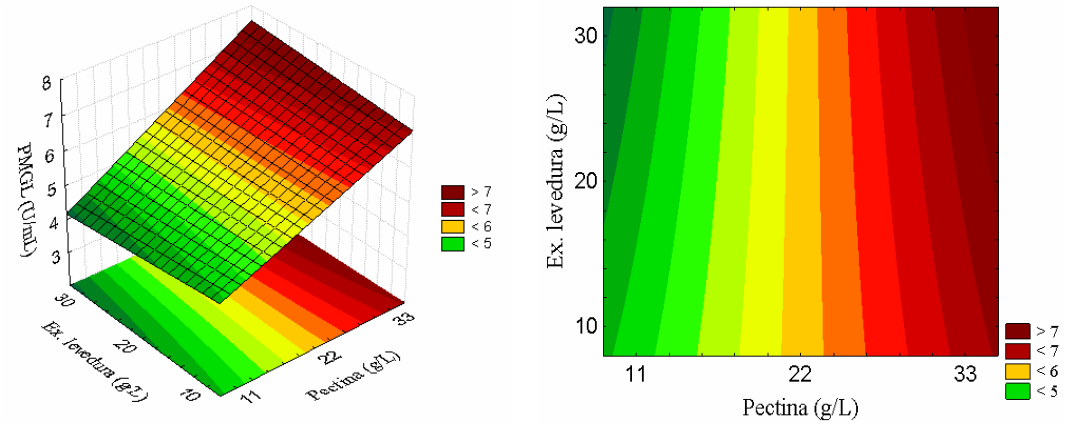
A Equação 6 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve a atividade da PMGL em função da variável pectina, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado 1,46 vezes maior que o valor tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 28, demonstrando que a máxima produção de PMGL encontra-se na faixa de concentração de pectina superior a 22 g/L de extrato de levedura inferior a 20 g/L e menor que 2 g/L de fosfato de potássio.

Equação 6:

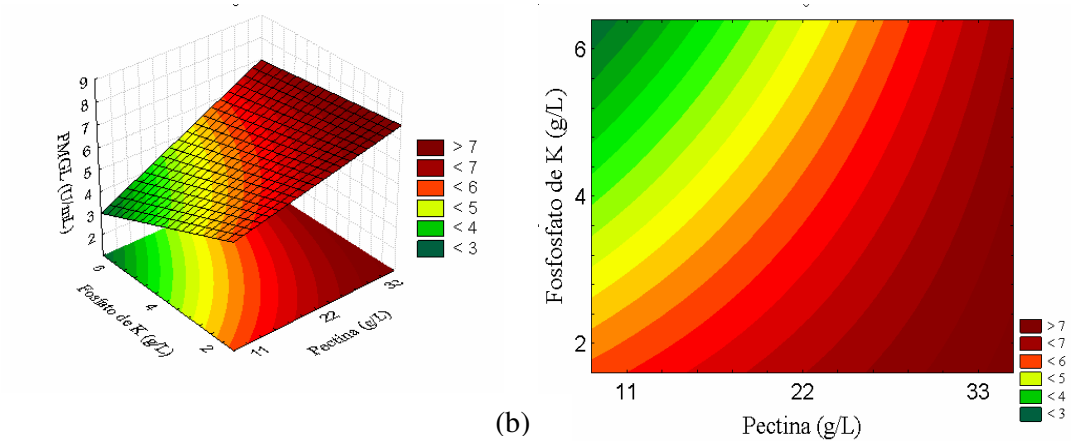
$$PMGL = 5{,}862 + 1{,}195\ X_1 \qquad (6)$$

Onde:

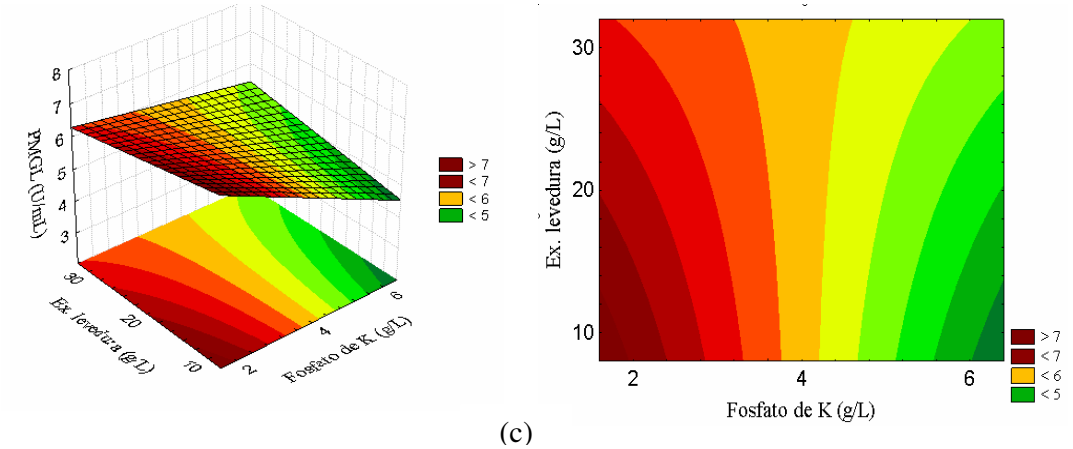
PMGL = Atividade de pectina liase (U/mL); X_1= pectina (g/L).



(a)



(b)



(c)

Figura 28 - Superfícies de resposta e curvas de contorno e para bioprodução de PMGL (U/mL) em função da concentração de extrato de levedura e pectina (a), concentração de pectina e fosfato de potássio (b) extrato de levedura e fosfato de potássio (c).

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 onde somente a variável pectina teve efeito significativo (Tabela 23), realizou-se um experimento em triplicata variando a concentração de pectina de 33, 40 e 45 g/L e fixando as concentrações de extrato de levedura (30 g/L), fosfato de potássio (2 g/L) a 180 rpm, 30°C, 48 horas e $pH_{inicial}$ 5,5. A Tabela 25, apresenta os resultados da atividade de PMGL (U/mL) em função da concentração de pectina cítrica.

Tabela 25 – Atividade de PMGL (U/mL) em função da concentração de pectina cítrica.

Ensaios	*Pectina cítrica (g/L)*	*Atividade de PMGL* (U/mL)*
1	33	$6,69 \pm 0,39^a$
2	40	$5,22 \pm 0,62^b$
3	45	$5,24 \pm 0,45^b$

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 25, verifica-se que a máxima produção de PMGL (6,69 U/mL) é obtida na concentração de pectina cítrica de 33 g/L, a qual não difere estatisticamente ($p< 0,05$) das concentrações de 40 e 45 g/L de pectina cítrica, indicando que o aumento da concentração de pectina cítrica pode inibir a produção desta enzima por excesso de substrato no meio de bioprodução além de dificultar a transferência de oxigênio por deixar o meio muito viscoso.

Na literatura raras são as informações que relatam a obtenção de pectina liase a partir de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*. Piccoli-Valle *et al.* (2001) obtiveram atividade de pectina liase de 16 U/mL pelo *Penicillium griseoroseum* após 48 horas de fermentação. Silva *et al.* (2002) estudaram a produção de pectina liase (PMGL) pela cepa de *Penicillium* v*iridicatum* Rfc3, por meio de fermentação em estado sólido usando bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e cascas de manga e banana como fontes de carbono. Quando os resíduos foram utilizados isoladamente, o valor máximo de atividade de PMGL (2000 U/g) foi obtido em meio de bagaço de laranja. A mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo (50 %) elevou a produção de PMGL para 3540 U/g.

A maioria dos trabalhos relatados em literatura empregam outras cepas de micro-organismos com diferentes substratos em meio sólido, Manachini *et al.* (1998) obtiveram 9 U/mL de pectina liase após 4 dias de fermentação pelo *Aureobasidium pullulan*. Cerca de 2500 U/mL de atividade foram produzidas por *Aspergillus niger* quando cultivado em meio contendo 2 % de milho por 6 dias (Naidu & Panda, 1999).

Thermoascus aurantiacus cultivados em meios contendo bagaço de laranja e farinha de trigo apresentaram atividade de 19300 e 11600 µmol/g de matéria seca/min após 12 e 14 dias de fermentação, respectivamente (Martins *et al.,* 2002). Camargo *et al.* (2005) estudaram a produção de pectina liase extracelulares a partir de *Aspergillus* sp. isolado do solo, em meio submerso contendo bagaço de laranja, pectina cítrica como única fonte de carbono, e após 68 horas a atividade foi de 11,3 U/mL. Martins *et al.* (2002), utilizando o micro-organismo termofílico *Thermoascus aurantiacus* obteve atividade de pectina liase de 5000 U/mL em meio composto por 90% de bagaço de laranja. Soares *et al.* (2001) através de FSS de farelo de trigo utilizando cinco linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus*, obtiveram 1000 U/g de PMGL.

Nos ensaios onde houve maiores atividade enzimáticas foram encontrados , de modo geral, os menores valores de pH, isto pode ser melhor visualizado pela Figura 29 onde encontra-se o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 para o pH, a variável pectina e a interação entre pectina e extrato de levedura tiveram efeito negativo significativo sobre o pH.

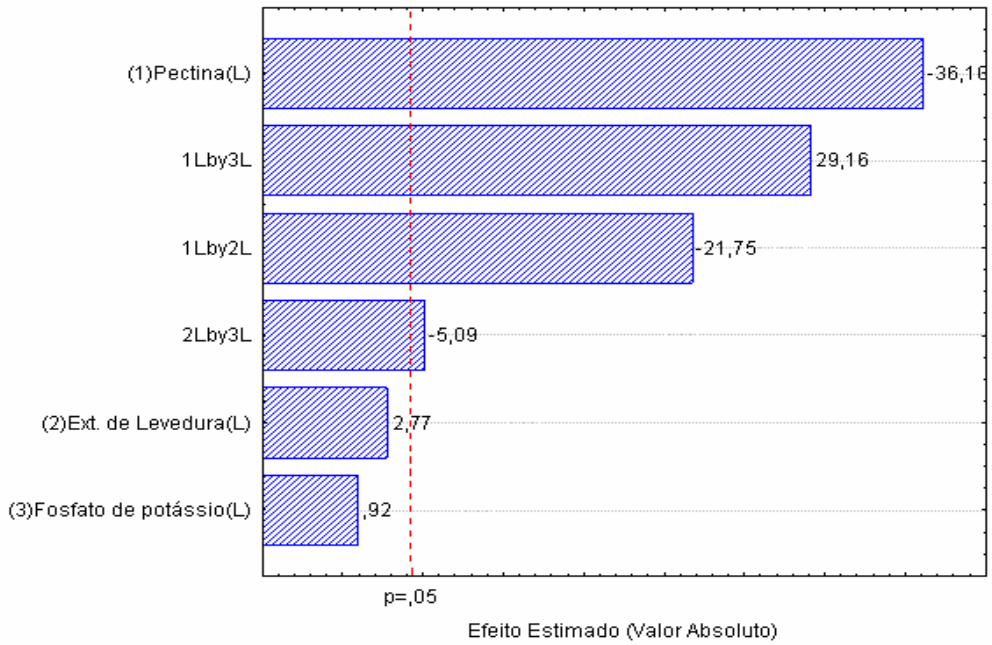


Figura 29 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^3 para o pH.

4.2.5.2. Estudo cinético da bioprodução de pectina liase (PMGL)

O estudo cinético (Figuras 30a e 30b) foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas (33 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio nas condições de 180 rpm, 30°C e $pH_{inicial}$ 5,5), tendo como objetivo avaliar a atividade da PMGL, o consumo de substratos, crescimento celular e o pH em função do tempo.

Observa-se na Figura 30a que a atividade máxima de PMGL (9,0 U/mL) foi obtida em 72 horas de incubação da cultura, neste mesmo período o micro-organismo atinge o final da fase exponencial. A atividade enzimática da PMGL (9,0 U/mL) obtida no presente estudo (*P. brasillianum*) é semelhante ao relatado por Santi (2005) que estudou a produção e caracterização de enzimas pectinolíticas produzidas por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais e verificou que quando o meio continha casca de laranja (1 %) ocorreu a maior produção de pectina liase (9,59 U/mL) após 96 horas de cultivo com agitação de 170 rpm e temperatura de 28ºC, seguida de meio com pectina cítrica (7,27 U/mL) e ao utilizar casca de uva e ácido galacturônico não produziu atividade expressiva de pectina liase (0,61 U/mL).

Em relação ao pH (Figuras 30a) do meio de bioprodução observa-se um comportamento praticamente estável durante todo o período de bioprodução (5,33 a 4,9).

Ao analisar o carbono orgânico total (Figura 30b), verifica-se que houve um consumo lento até as 27 horas e após este período uma diminuição gradativa até as 86 horas, ou seja, um consumo de 40 % (COT final de 136 mg/L). Comportamento similar foi verificado para o teor de Ferro, com um consumo de 66 % (Fe final de 11,21 mg/L). No entanto, a assimilação de nitrogênio foi lenta e gradativa ao longo de todo o processo fermentativo, com um consumo total de 25 %. Em relação ao potássio a diminuição foi maior nas primeiras 6 horas de fermentação (2900 a 2600 mg/L) e após este período permaneceu praticamente constante (2600 a 2520 mg/L). Analisando a cinética, o mesmo comportamento foi constatado para os teores de magnésio, porém nas primeiras nove horas o consumo foi de 60 % e até as 86 horas a assimilação foi de 88 %.

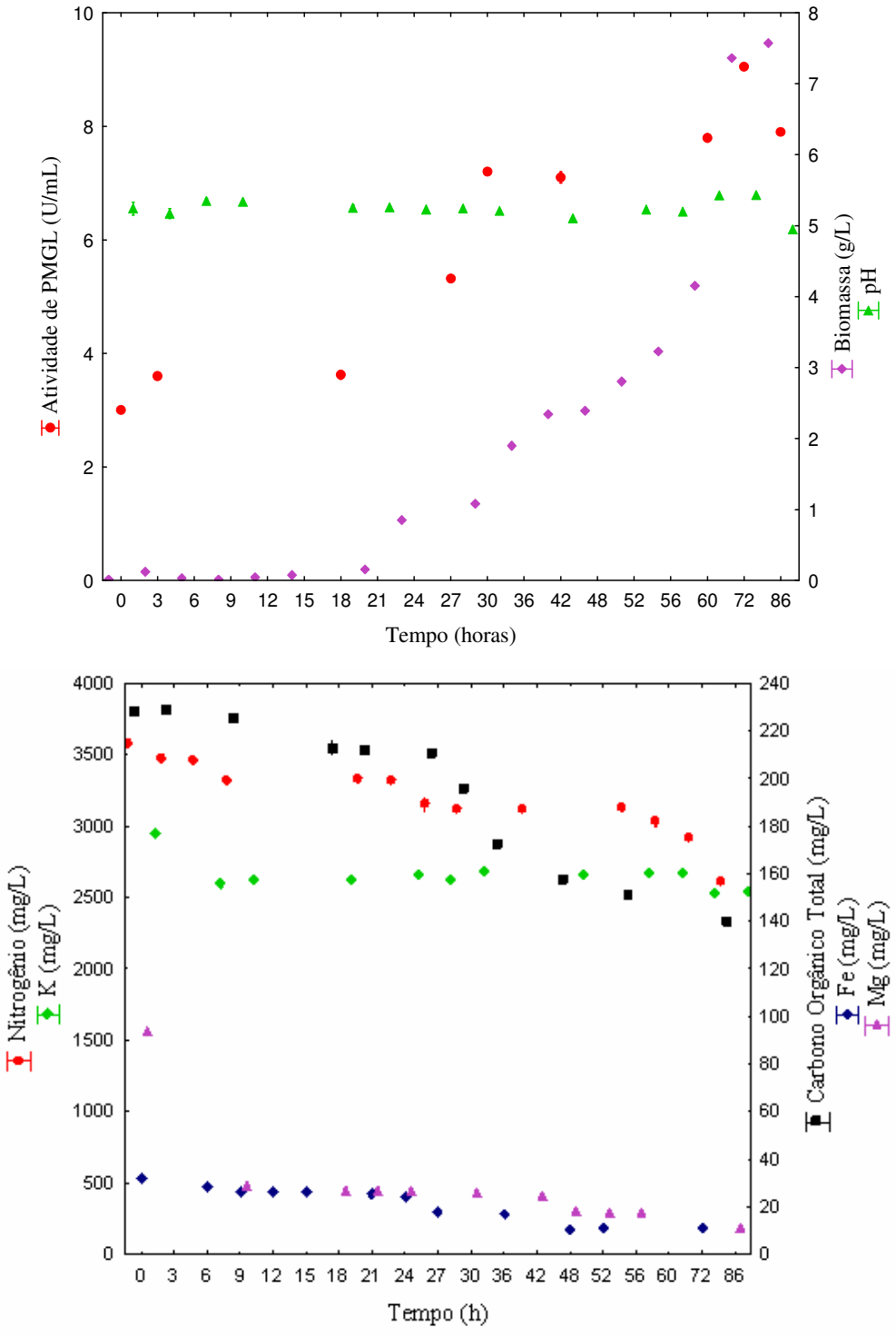


Figura 30 - Estudo cinético da bioprodução de PMGL em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L) e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono, nitrogênio e minerais pelo tempo (horas) (b), respectivamente.

4.2.5.3. Caracterização parcial da pectina liase (PMGL)

Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto de PMGL produzido em condições maximizadas (33 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio, 180 rpm, 30°C, 72 horas e $pH_{inicial}$5,5) foram definidos baseados em um planejamento de experimentos.

A Tabela 26 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais) bem como os resultados da atividade enzimática da pectina liase (PMGL). Observa-se que a maior atividade, 11,97 U/mL, foi verificado no ensaio 2 em pH 5,5 e temperatura de 37°C.

A Tabela 27 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectina liase a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que as variáveis independentes estudadas, temperatura e pH, apresentaram influência na atividade de PMGL, sendo que o pH apresentou efeito significativo positivo. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA).

Tabela 26 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática da pectina liase em função de temperatura e pH.

Ensaios	****Variáveis Independentes***		***Pectina liase***
	pH	***Temperatura (°C)***	***(U/mL)***
1	-1 (3,4)	-1 (37)	7,32
2	1 (5,5)	-1 (37)	11,97
3	-1 (3,4)	1 (73)	7,01
4	1 (5,5)	1 (73)	10,85
5	-1,41 (3)	0 (55)	7,20
6	1,41 (6)	0 (55)	9,14
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	8,96
8	0 (4,5)	1,41 (80)	7,84
9	0 (4,5)	0 (55)	9,91
10	0 (4,5)	0 (55)	10,44
11	0 (4,5)	0 (55)	10,17

Tabela 27 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de pectina liase em função de temperatura e pH ótimos.

	Coeficiente de Regressão	*Erro padrão*	*t(2)*	*p*
Média	10,17	0,15	66,88	0,0002
(1)pH (L)*	1,41	0,09	15,09	0,0044
pH (Q)	-0,75	0,11	-6,75	0,0213
(2)Temperatura(L)	-0,38	0,09	-4,05	0,0558
Temperatura(Q)*	-0,63	0,11	-5,70	0,0294
1L.2L	-0,20	0,13	-1,53	0,2653

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 7 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PMGL em função das variáveis analisadas (Temperatura e pH), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 28) onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,88 e o F calculado de 1,41 vezes maior que o valor tabelado, o qual permitiram a validação do modelo e a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 31.

Tabela 28 - Análise de variância para a atividade de PMGL do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.

Fontes de variação	*Soma dos quadrados*	*Graus de liberdade*	*Quadrados médios*	*F calculado*
Regressão	20,00	3	6,67	6,16
Resíduo	7,58	7	1,08	
Falta de Ajuste	7,44	5		
Erro Puro	0,14	2		
Total	27,58	10		

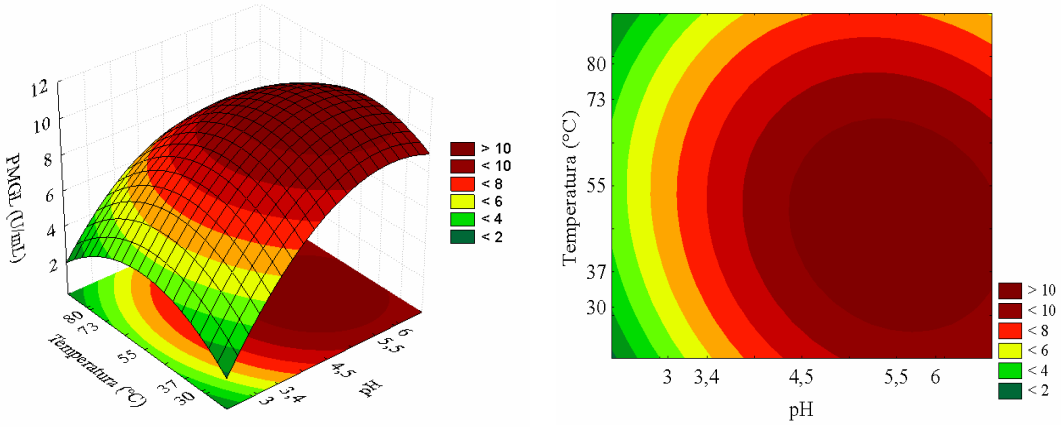
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{tab} = 4,35$

Equação 7:

$$\text{Atividade PMGL (U/mL)} = 10,17 + 1,41(pH) - 0,63\ (T)^2 \quad (7)$$

Onde:

PMGL = Atividade de Pectina liase (U/mL); T = Temperatura (ºC)



(a) (b)

Figura 31– Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade de PMGL (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH.

De acordo com a Figura 31 verifica-se que a máxima atividade do extrato enzimático bruto encontra-se na faixa de pH 4,5 a 6,5 e temperatura de 30 a 60°C. Com base na literatura, as temperaturas e pH ótimos para a PMGL variam de acordo com o micro-organismo produtor. Yadav *et al.* (2009), citam em seu estudo sobre a pectina liase que os pH e temperaturas (°C) ótimas para a PMGL produzida de vários micro-organismos, sendo que o pH ótimo varia de 5 a 10,5 e as temperaturas de 32 a 60°C dependendo do micro-organismo. Silva *et al.* (2002) estudaram a produção de pectina liase (PMGL) pela cepa de *Penicillium viridicatum* Rfc3, no qual a referida enzima caracterizada apresentou atividade ótima em pH 10,5 e temperatura de 50ºC.

Parini *et al.,* (1988) com o micro-organismo *Aureobasidium pullulans* LV 10 obtiveram atividade enzimática máxima observada a 40°C. Em estudo empregando a bactéria *Erwinia carotovora* subsp. *atrosseptica* linhagem SCRI 1043 para a produção de PMGL, a temperatura ótima de atividade foi de 35°C (Godfrey *et al.,* 1994). Comportamento semelhante foi verificado por Tsuyumu & Funakubo (1985) ao avaliar a atividade da PMGL obtida de *Erwinia chrysanthemi* linhagem EC 183.

Avaliação da estabilidade térmica

A avaliação da estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL foi realizada incubando esta em diferentes temperaturas, acompanhando o comportamento em função do tempo. O extrato de pH 5,25 foi incubado nas temperaturas avaliadas (-80, -10, 4, 30,

40, 50, 60 e 70°C) as amostras de cada ensaio foram coletadas nos tempos de zero (horas) e 768 (horas) para a determinação da atividade de PMGL. Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade são apresentados na Tabela 29. Verifica-se que em baixas temperaturas de -80, -10 e 4°C, o extrato enzimático bruto reteve 41, 46 e 56 % de sua atividade de PMGL inicial respectivamente, após 768 horas de armazenamento. No entanto, a atividade residual a altas temperaturas manteve-se estável neste período de armazenamento com valores superiores a 67 %.

Tabela 29– Influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL.

Temperatura (°C)	*Atividade Residual (%)*
-80	41,23 ± 1,64 [e]
-10	46,00 ± 2,00 [d]
4	56,30 ± 1,35 [c]
30	66,65 ± 1,03 [b]
40	70,21 ± 3,00 [a]
50	69,14 ± 2,70 [a]
60	72,36 ± 1,03 [a]
70	72,56 ± 1,67 [a]

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

Os valores de estabilidade térmica do extrato enzimático bruto obtidos neste trabalho são semelhantes aos reportado por Silva *et al.* (1993) que estudando a pectina liase produzida por *Penicillium expansum*, observaram que a faixa de temperatura ótima de atividade encontrava-se entre 40 e 45°C. Menezes (2006), avaliando a estabilidade da PMGL do fungo *P. griseoroseum*, observou que a enzima é estável até 40°C, perdendo totalmente sua atividade quando mantida a 55°C durante uma hora. Silva *et al.* (2002) avaliaram a estabilidade da PMGL produzida por *Penicillium* v*iridicatum* Rfc3, e verificaram maior estabilidade térmica a 35ºC por uma hora.

Pesquisas relatam que a estabilidade térmica da enzima pode estar relacionada com sua estrutura, e pode ser influenciada com fatores como, pH e íons metálicos, por exemplo. Alguns autores indicam que a estabilidade térmica de uma enzima pode ser melhorada na presença de alguns cátions como Ca^{2+}, Na^{+} entre outros (Sharma *et al*., 2001).

Avaliação da estabilidade em diferentes pH

A estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL frente a diferentes pHs foi realizada acompanhando o comportamento em função do tempo. O extrato de pH 5,25 foi incubado 40°C, e avaliou-se os diferentes pH (3; 3,4; 4,5; 5,5; 6; 7 e 8). As amostras de cada ensaio foram coletadas nos tempos de zero (hora) e 312 horas para a determinação da atividade de pectina liase (PMGL). Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade frente ao pH são apresentados na Tabela 30. Verifica-se que nos pH 3 e 3,4, o extrato enzimático bruto reteve 81 e 77 % da atividade da PMGL inicial após 312 horas de armazenamento. No entanto, a atividade residual nos demais pH manteve-se estável com atividade residual de 90 %.

Tabela 30 – Influência dos pH na estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL.

pH	***Atividade Residual (%)***
3	81,15 ± 2,10 [b]
3,4	77,54 ± 1,64 [c]
4,5	94,31 ± 1,00 [a]
5,5	90,57 ± 4,00 [a]
6	90,67 ± 3,22 [a]
7	90,45± 2,50 [a]
8	90,33 ± 3,42 [a]

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

Silva *et al.* (2002) estudaram a produção de pectina liase (PMGL) pela cepa de *Penicillium* v*iridicatum* Rfc3, no qual a referida enzima apresentou maior estabilidade em pH ácido.

4.2.6. Pectinametilesterase (PME)

4.2.6.1. Produção de pectinametilesterase em frascos agitados

De acordo com os resultados obtidos com o planejamento experimental Plackett–Burman no Tabela 13, as faixas das variáveis foram ampliadas, sendo que a Tabela 31 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 e as respostas em atividade enzimática de PME e pH.

Tabela 31 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resposta em produção de Pectinametilesterase e pH.

Ensaios	*Variáveis Independentes**			*Respostas*	
	X_1	X_3	X_5	*PME (U/mL)*	*pH*
1	-1 (22)	-1 (20)	-1 (4)	1,70	5,20
2	1 (32)	-1 (20)	-1 (4)	2,10	4,92
3	-1 (22)	1 (30)	-1 (4)	2,50	5,16
4	1 (32)	1 (30)	-1 (4)	2,40	5,02
5	-1 (22)	-1 (20)	1 (8)	3,10	5,07
6	1 (32)	-1 (20)	1 (8)	3,50	4,96
7	-1 (22)	1 (30)	1 (8)	3,50	5,14
8	1 (32)	1 (30)	1 (8)	4,00	5,00
9	0 (27)	0 (25)	0 (6)	3,20	5,01
10	0 (27)	0 (25)	0 (6)	3,00	5,05
11	0 (27)	0 (25)	0 (6)	3,20	5,10

*X_1= Pectina (g/L), X_3= Extrato de levedura (g/L), X_5= Fosfato de potássio (g/L). Variável fixa: Sulfato de ferro (II) (0,02g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, 24 horas e $pH_{inicial}$=5,5.

De acordo com a Tabela 31, verifica-se que a máxima atividade de pectinametilesterase foi de 4,0 U/mL (Ensaio 8), com 32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro (II) nas condições de 180 rpm, 30°C, 24 horas de bioprodução, $pH_{inicial}$ de 5,5 e concentração de esporos de $5x10^6$ esporos/mL.

As variáveis fosfato de potássio e extrato de levedura apresentaram efeito significativo positivo ($p<0,05$) sobre a produção da enzima PME (Tabela 32) indicando que possivelmente o aumento da concentração de fosfato de potássio e extrato de levedura ocasionaria um incremento na atividade de pectinametilesterase (PME). Neste sentido, um experimento (em triplicata) foi conduzido aumentando as concentrações das variáveis para 35 g/L de pectina, 35 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de fosfato de potássio e fixando em 0,02 g/L de sulfato de ferro (II),180 rpm, 30°C, 24 horas de bioprodução, pH inicial de 5,5 e $5x10^6$esporos/mL. Nestas condições não foi verificado um aumento significativo na produção de pectinametilesterase (4,10 U/mL), demonstrando que a maximização da produção de PME foi de 4,0 U/mL com uma concentração de esporos de $5x10^6$ esporos/mL a 30°C, pH 5,5 e meio de cultivo composto de 32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro (II).

Tabela 32 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2^2 para atividade de PME.

	Coeficiente de Regressão	***Erro padrão***	***t(2)***	***p***
Média	2,930	0,034	84,079	0,00014
(4) Pectina (L)	0,150	0,040	3,674	0,06674
(5) Extrato de Levedura (L) *	0,250	0,040	6,123	0,02564
(6) Fosfato de K (L)*	0,675	0,040	16,534	0,00363
1L.2L	-0,050	0,040	-1,224	0,34534
1L.3L	0,075	0,040	1,837	0,20759
2L.3L	-0,025	0,040	-0,612	0,60264

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

A Equação 8 apresenta o modelo codificado de primeira ordem, em função das variáveis analisadas (pectina, extrato de levedura e fosfato de potássio), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado de 7,48 vezes maior que o valor tabelado. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância ANOVA (Tabela 33).

Tabela 33- Análise de variância para a atividade de PME do planejamento fatorial 2^2.

Fontes de variação	***Soma dos quadrados***	***Graus de liberdade***	***Quadrados médios***	***F calculado***
Regressão	4,15	2	2,07	33,37
Resíduo	0,50	8	0,06	
Falta de Ajuste	0,470152	6		
Erro Puro	0,026667	2		
Total	4,641818	10		

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

Equação 8:

$$PME = 2,93 + 0,25\ X_3 + 0,67\ X_5 \quad (8)$$

Onde:

PME = Atividade de Pectinametilesterase (U/mL); X_3 = Extrato de levedura (g/L); X_5= Fosfato de potássio (g/L).

A Figura 32 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 em função do pH, onde se observa que a variável pectina influenciou na redução do pH.

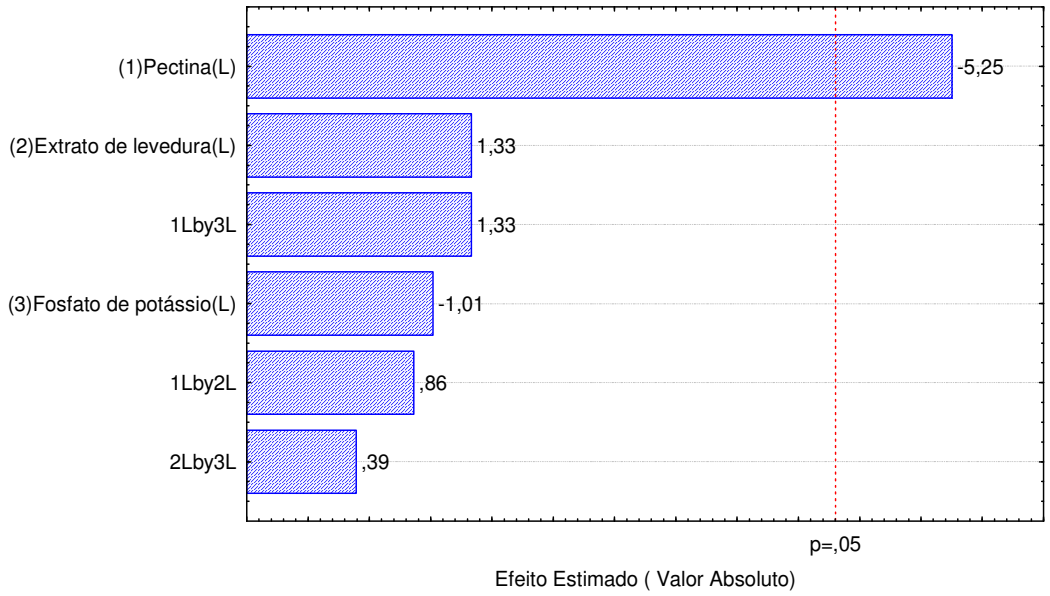


Figura 32 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^3 em função do pH.

4.2.6.2. Estudo cinético da bioprodução de pectinametilesterase (PME)

O estudo cinético de bioprodução de PME, consumo de substrato, biomassa e pH (Figuras 33a e 33b) foram realizados a partir das condições experimentais maximizadas em frascos agitados (32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio, 0,02 g/L de sulfato de ferro II, $5x10^6$ esporos/mL, 30°C, 180 rpm e $pH_{inicial}$ 5,5).

De acordo com a Figura 33a, observa-se que a atividade máxima (4,80 U/mL) foi obtida em 27 horas de incubação da cultura, salientando que a maior produção de PME está relacionada ao inicio da fase exponencial de crescimento do micro-organismo. O pH permaneceu praticamente estável (~ 5,5) até as 36 horas de bioprodução, com posterior decréscimo atingindo em 48 horas pH_{final} de 4,5.

Ao analisar a assimilação dos substratos, observa-se comportamento similar em relação ao nitrogênio (Figura 33a), ferro e potássio (Figura 33b), com diminuição lenta e gradativa ao longo do processo fermentativo, com consumo total de 13, 13 e 11 %, respectivamente. Das fontes de minerais, as maiores assimilações foram para o

manganês e magnésio, correspondendo 26 e 82 % de consumo total, respectivamente. Em relação ao carbono orgânico total (Figura 33b), a concentração permaneceu praticamente constante até 24 horas e em 27 horas, período da máxima bioprodução de PME (4,80 U/mL), verificou-se o maior consumo de fonte de carbono (15 %) e após este período a concentração manteve-se praticamente constante (222 a 210mg/L).

Ressalta-se que a atividade enzimática da PME (4,80 U/mL) obtida pelo fungo filamentoso *P. brasillianum,* no presente estudo, é semelhante ao relatado por Aquino (2008) em preparado enzimático comercial (Pectinex AR), que apresentou atividade de 3,58 U/mL, sendo que para outros preparados comerciais como a Pectinex Ultra SP-L, Pectinex AR, Ultrazym AFP-L, Biopectinase CCM e Viscozyme L, a atividade da PME foi de 18,90; 29,98; 18,25 e 61,26 U/mL, respectivamente. No entanto, sendo superior a atividade (1,47 U/mL) obtida dos resíduos industriais da polpa do abacaxi (*Ananas comosus* L. *Merr)* - cv. Pérola (Carvalho, 2007).

Estudos realizados com a enzima PME produzida a partir de micro-organismos ainda são escassos na literatura, os mais citados referem-se aos obtidos de frutos e derivados: mamão (Lourenço & Catutani, 1984), maçã (Johnston *et al.,* 2002), pêssego (Oliveira *et al.,* 2005), framboesa (Iannetta *et al.,* 1999), carambola (Chin *et al.,* 1999), pêra (Brummell *et al.,* 2004), tomate (Hobson, 1963) e banana (Hiltin & Levine, 1966; Sales *et al.,* 2004), manga (Prasanna *et al.,* 2003) e tomate (Resende *et al.,* 2004). No entanto, a produção biotecnológica de PME para a aplicação industrial, através de micro-organismo, apresenta como vantagens a produção em pequeno espaço, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo como as extraídas de frutas e/ou derivados; existindo a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de pectinases de maior importância e a utilização de substratos de baixo custo.

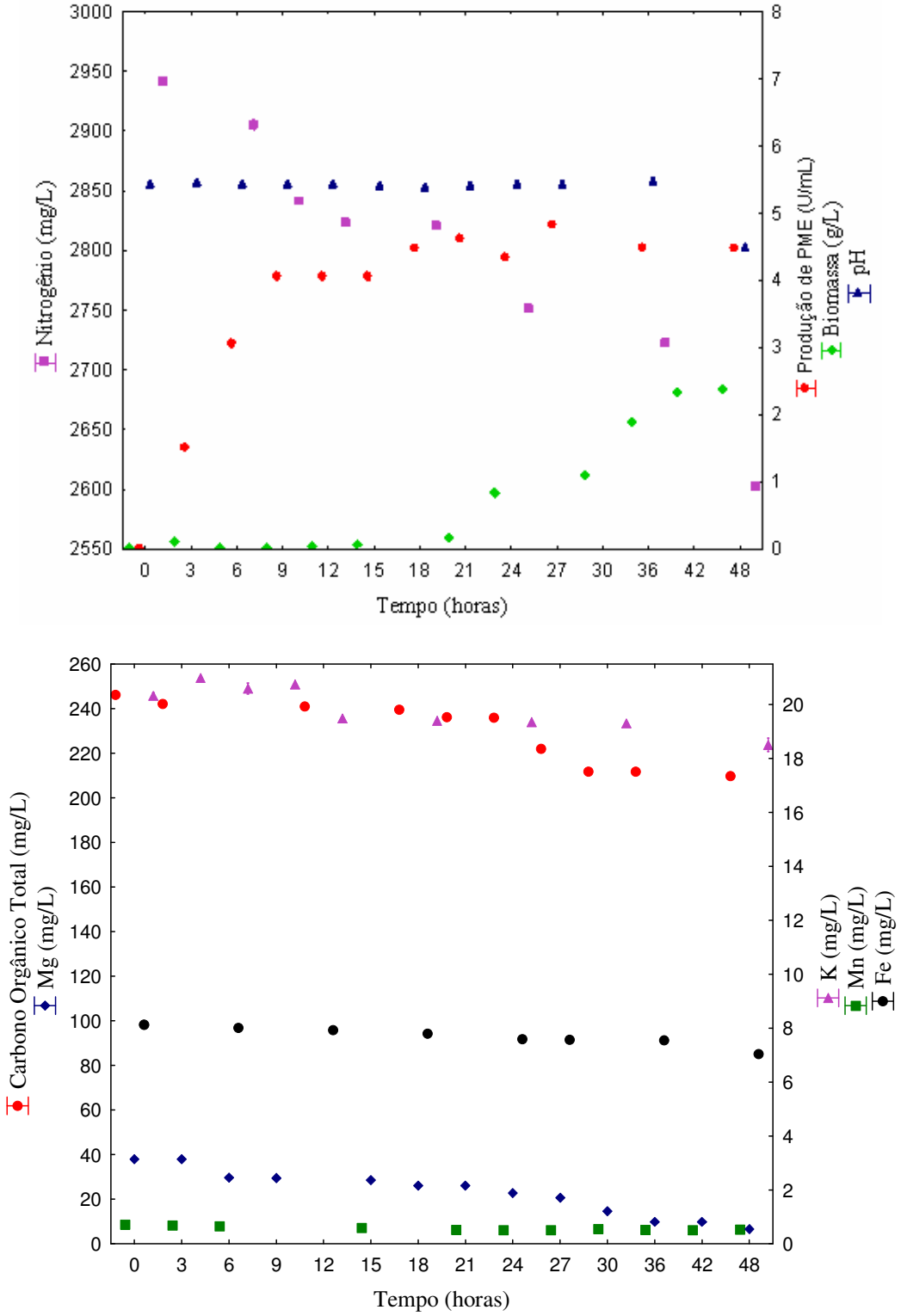


Figura 33 – Estudo cinético da bioprodução de PME em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L), nitrogênio e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono e minerais pelo tempo (horas) (b).

4.2.6.3. Efeito da concentração de sais no meio reacional da medida de atividade da pectinametilesterase (PME)

Para o estudo do efeito das concentrações de sais no meio reacional da medida de atividade da PME, foi utilizado o extrato enzimático bruto obtido nas condições maximizadas de produção foi utilizado. As concentrações dos sais NaCl, $CaCl_2$ e a mistura NaCl/$CaCl_2$ variaram de 0,02 a 1 M. A Tabela 34 apresenta as concentrações dos sais NaCl, $CaCl_2$ e a mistura de NaCl/$CaCl_2$ no meio reacional da medida de atividade da PME, verifica-se que quando foi utilizado o sal $CaCl_2$ foram obtidas as maiores atividades de PME 10,17; 10,13 e 11,23 U/mL nas concentrações de 0,50; 0,75 e 1 M, respectivamente, estas não diferindo estatisticamente (nível de 95 % de confiança) entre si. As atividades obtidas na associação dos sais NaCl e $CaCl_2$ nas concentrações de 0,75 (10,70 U/mL) e 1 M (11,20 U/mL) quando comparadas as atividades das concentrações 0,50; 0,75 e 1 M do sal $CaCl_2$ não apresentam diferença significativa entre si a nível de 95 % de confiança, indicando que pode-se usar qualquer uma destas concentrações dos referidos sais para obter a mesma atividade enzimática da PME. Com base nestes resultados passou-se a realizar a medida de atividade da PME com o sal $CaCl_2$ 0,5 M.

Tabela 34 – Atividade da PME em diferentes concentrações dos sais NaCl, $CaCl_2$ e a mistura NaCl/$CaCl_2$.

Concentrações dos Sais (M)	***NaCl***	***$CaCl_2$***	***NaCl/$CaCl_2$***
0,02	5,10 ± 0,14 $^{a\ A}$	4,87 ± 0,25 $^{e\ A}$	3,30 ± 0,20 $^{i\ B}$
0,04	5,25 ± 0,07 $^{a\ A}$	5,43 ± 0,12 $^{e\ A}$	5,00 ± 0,28 $^{h\ A}$
0,06	5,55 ± 0,29 $^{a\ B}$	6,63 ± 0,32 $^{d\ AB}$	7,27 ± 0,29 $^{f\ A}$
0,08	5,90 ± 0,15 $^{a\ B}$	6,70 ± 0,20 $^{d\ A}$	6,9 ± 0,10 $^{f\ A}$
0,1	5,05 ± 0,07 $^{a\ C}$	7,27 ± 0,23 $^{cd\ B}$	8,15 ± 0,07 $^{e\ A}$
0,15	5,70 ± 0,30 $^{a\ B}$	8,47 ± 0,25 $^{c\ A}$	8,55 ± 0,35 $^{de\ A}$
0,2	5,27 ± 0,35 $^{a\ B}$	8,63 ± 0,23 $^{b\ A}$	8,80 ± 0,10 $^{d\ A}$
0,25	5,75 ± 0,35 $^{a\ B}$	8,33 ± 0,21 $^{c\ A}$	6,93 ± 0,32 $^{f\ B}$
0,3	5,25 ± 0,07 $^{a\ C}$	7,80 ± 0,30 $^{c\ A}$	7,17 ± 0,31 $^{f\ B}$
0,4	4,73 ± 0,15 $^{a\ C}$	9,00 ± 0,10 $^{b\ B}$	9,97 ± 0,42 $^{b\ A}$
0,5	5,20 ± 0,12 $^{a\ C}$	10,17 ± 0,25 $^{a\ A}$	9,33 ± 0,15 $^{c\ B}$
0,75	5,27 ± 0,35 $^{a\ B}$	10,13 ± 0,38 $^{a\ A}$	10,70 ± 0,10 $^{ab\ A}$
1	5,57 ± 0,45 $^{a\ B}$	11,23 ± 0,23 $^{a\ A}$	11,20 ± 0,20 $^{a\ A}$

*Valores de atividade de pectinametilesterase (U/mL) ± desvio padrão seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

Cardello & Lourenço (1992), avaliaram a utilização dos sais NaCl e $CaCl_2$ e 0,125 % de pectina no meio reacional e verificaram que os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 0,15 e 0,04 M em NaCl e $CaCl_2$, respectivamente, com valores de atividade aproximadamente 6 U/mL para os dois sais estudados. Já quando analisaram a associação dos sais, NaCl e $CaCl_2$ e 0,5 % de pectina cítrica, variando a molaridade, verificaram que a atividade foi de aproximadamente 9 U/mL para todas as molaridades estudadas (0,04 a 0,5 M).

4.2.6.4. Efeito da concentração de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da pectinametilesterase (PME)

O sal $CaCl_2$ 0,5 M foi usado no meio reacional da medida de atividade da PME conforme definido no item 3.5.5, nesta condição avaliou-se os efeitos da variação de concentração de pectina cítrica (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 %) na medida de atividade da PME (Figura 34). O extrato enzimático utilizado para a medida de atividade foi obtido nas condições maximizadas de produção.

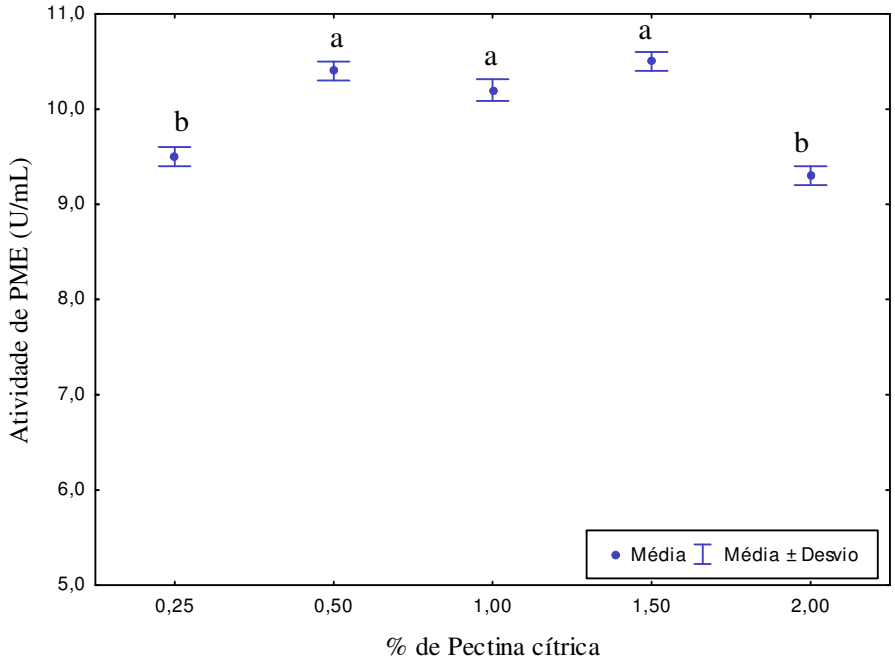


Figura 34 – Determinação da atividade da PME avaliando diferentes concentrações de pectina cítrica no meio reacional.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 34, observa-se que as concentrações de pectina de 0,5; 1,0 e 1,5 % não apresentam diferença significativa entre si a nível de 95 % de confiança, demonstrando que é possível usar a concentração de 0,5% de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME e obter-se-á a mesma atividade de PME quando usada as concentrações de 1 e 1,5%. A partir destes resultados a medida de atividade da PME foi realizada com 0,5 % de pectina e $CaCl_2$ 0,5 M, conforme definido anteriormente, visando a diminuição de custos de processo.

4.2.6.5. Caracterização parcial da pectinametilesterase (PME)

Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto de PME produzido em condições maximizadas (32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro (II), $5x10^6$ esporos/mL, 30°C, 27 horas, $pH_{Inicial}$ 5,5 e 180 rpm) foram definidos baseados em um planejamento de experimentos. A Tabela 35 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais), bem como os resultados da atividade enzimática da pectinametilesterase, na qual observa-se a maior atividade de PME (40,00 U/mL) no ensaio 6, com pH 11 e temperatura de 55°C.

Tabela 35 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática de pectinametilesterase em função de temperatura e pH.

Ensaios	****Variáveis Independentes***		***Respostas***
	pH	***Temperatura (°C)***	***PME (U/mL)***
1	-1 (5,54)	-1 (37)	5,00
2	1 (9,8)	-1 (37)	36,00
3	-1 (5,54)	1 (73)	11,60
4	1 (9,8)	1 (73)	38,00
5	-1,41 (5)	0 (55)	2,90
6	1,41 (11)	0 (55)	40,00
7	0 (7)	-1,41 (30)	11,10
8	0 (7)	1,41 (80)	13,70
9	0 (7)	0 (55)	11,60
10	0 (7)	0 (55)	11,80
11	0 (7)	0 (55)	11,90

A Tabela 36 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectinametilesterase a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que as variáveis estudadas influenciaram na atividade da PME, sendo que pH e temperatura isolados apresentaram efeito positivo, porém a interação pH e temperatura foi negativo.

Tabela 36 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de PME em função de temperatura e pH.

	Coeficiente de Regressão	***Erro padrão***	***t(2)***	***p***
Média	11,744	0,0881	133,1669	0,000056
(1)pH (L)*	13,754	0,0540	254,310	0,000015
pH (Q)*	6,314	0,0645	97,831	0,000104
(2)Temperatura(L)*	1,537	0,0540	28,432	0,001235
Temperatura(Q)*	1,761	0,0645	27,299	0,001339
1L.2L*	-1,150	0,0763	-15,057	0,004382

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 9 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PME em função das variáveis analisadas (Temperatura e pH), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 37), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,98 e o F calculado de 4,94 vezes maior que o valor tabelado, o qual permitiu, também, a construção da superfícies de resposta e/ou curva de contorno apresentadas na Figura 33.

Tabela 37 - Análise de variância para a atividade de PME do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH.

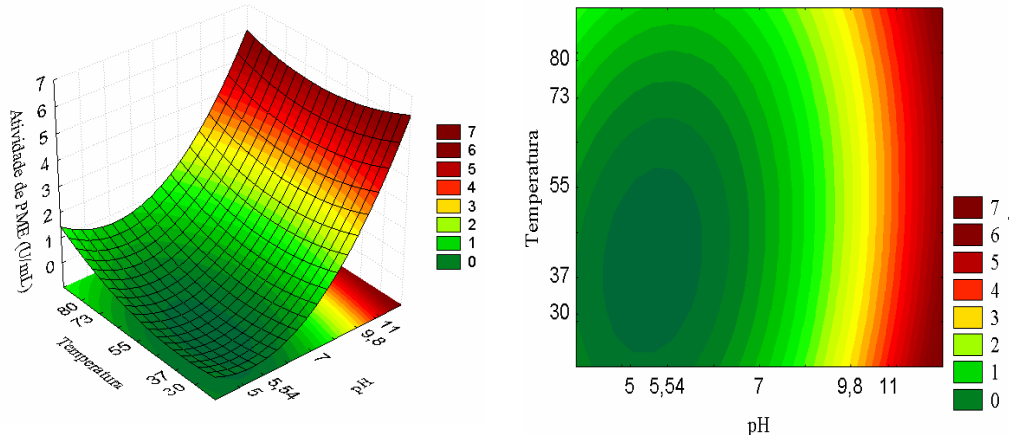
Fontes de variação	***Soma dos quadrados***	***Graus de liberdade***	***Quadrados médios***	***F calculado***
Regressão	1756,57	5	351,31	24,97
Resíduo	70,35	5	14,07	
Falta de Ajuste	70,307	3		
Erro Puro	0,047	2		
Total	1826,920	10		

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

Equação 9:

$$\text{Atividade PME (U/mL)} = 11,744 + 13,754.pH + 6,314.(pH)^2 + 1,537.T + 1,761.(T)^2 - 1,150.(pH).(T) \quad (9)$$

Onde: PME = Atividade de pectinametilesterase (U/mL); T = Temperatura (ºC)



(a) (b)

Figura 35 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PME (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH.

De acordo com a Figura 35, verifica-se uma ampla faixa de temperatura (30 a 80ºC) e pH na faixa de 9 a 11 com maiores atividades de PME.

A literatura relata a influência do pH e temperatura sobre a medida da atividade de PME principalmente de enzimas extraídas de frutas. Gonzalez (2009) determinou as condições ótimas da atividade da PME presente em preparações industriais (Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears) e observou que as maiores atividades foram em pH 4,0 a 4,5 e temperatura de 45ºC. Assis *et al.* (2002) relataram para a PME de acerola (*Malpighia glabra L.*), um valor superior com pH ótimo igual a 9,0. Já pesquisas realizadas com outras frutas apresentaram resultados com valores inferiores de pH, como, por exemplo, com suco de laranja da variedade Pêra–Rio, detectou-se pH ótimo igual a 8,0 (Amaral, Assis & Oliveira, 2005), ou 7,5 (Termote & Ilnik, 1977). Ly-Nguyen *et al.* (2002) encontraram pH ótimo em torno de 6,9 a 7,0 em PME de morangos. Sainz *et al.* (2007), estudando o comportamento e atividade *in vitro* das enzimas pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG) em pêssegos verificaram que a poligalacturonase da cv. Eldorado mostrou máxima atividade no entorno do pH 5,0 enquanto que, para a pectinametilesterase, a máxima atividade foi observada no pH 7,0. Para poligalacturonase e pectinametilesterase a temperatura ótima foi a de 25ºC.

Em estudos de purificação as faixas de temperaturas e pH foram semelhantes as relatadas neste estudo. Arbaisah *et al.* (1997), estudando a purificação da PME de polpa

de graviola (*Anona muricata*), determinou o pH ótimo na faixa de 7,0-8,0. Amaral, Assis & Oliveira (2005) estudando o efeito da temperatura sobre a atividade da laranja cv. Pera-rio, também verificaram a temperatura ótima da PME purificada parcialmente extraída em 50°C.

Avaliação da estabilidade térmica

A avaliação da estabilidade térmica (Tabela 38) do extrato enzimático bruto (pH 5,43) da PME foi realizada incubando esta em diferentes temperaturas (-80, -10, 4, 30, 40, 50, 60, 70 e 100°C), acompanhando o comportamento em função do tempo. Verifica-se que em baixas temperaturas de -80, -10 e 4°C, o extrato enzimático bruto reteve cerca de 80 % de sua atividade de PME inicial após 888 horas de armazenamento. No entanto, a atividade residual a altas temperaturas apresentou um comportamento diferenciado com acréscimo na atividade inicial de 15, 25, 10, 10 e 50%, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C em 888 horas, respectivamente. Já a atividade residual a 100°C, por período de 744 horas, apresentou um incremento de 25%.

Tabela 38 – Influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático bruto da PME.

Período (horas)	***Temperatura (°C)***	***Atividade Residual (%)***
888	-80	83,04 ± 4,01 [e]
	-10	82,45 ± 3,75 [e]
	4	89,34 ± 2,10 [e]
	30	115,12 ± 4,15 [c]
	40	125,10 ± 2,83 [b]
	50	110,32 ± 2,67 [cd]
	60	110,76 ± 1,98 [cd]
	70	150,46± 2,98 [a]
744	100	125,25 ± 3,08 [b]

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

Os resultados deste trabalho são semelhantes aos relatados por Carvalho (2007) que avaliou a estabilidade térmica da PME concentrada da polpa de abacaxi e verificou que ocorre um acréscimo na atividade da PME de 45,9 % quando incubada a 25°C e de 100% quando incubada a 40°C, ambas por 60 minutos. Leite *et al.* (2006), quando estudava os efeitos da estabilidade térmica da PME em polpa de goiaba cv. Paluma. amostras submetidas a 75°C também apresentaram um acréscimo de 64,77 % na

atividade enzimática da PME concentrada em relação a inicial. Ressalta-se que a avaliação da estabilidade térmica do extrato enzimático bruto desta enzima encontra-se em andamento.

Avaliação da estabilidade em diferentes pH

A avaliação da estabilidade do extrato enzimático bruto da PME foi realizada incubando este em diferentes pH (5, 7, 9 e 11), acompanhando o comportamento em função do tempo. As amostras de cada ensaio foram coletadas nos tempos de zero (hora) e 816 horas para a determinação da atividade de PME. Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade frente ao pH são apresentados na Tabela 39. Verifica-se que a atividade residual nos diferentes pH manteve-se estável pelo período de armazenamento de 816 horas com valores superiores a 95 %.

Cardello & Lourenço (1992) avaliaram a estabilidade da PME de berinjela parcialmente purificada, após incubação de 60 minutos e concluíram que a PME é estável em valores de pH na faixa de 5 a 8.

Tabela 39 – Influência dos pH na estabilidade do extrato enzimático bruto da PME.

pH	***Atividade Residual (%)***
5	97,03 ± 3,45 [a]
7	98,13 ± 2,75 [a]
9	96,40 ± 3,65 [a]
11	95,30 ± 1,82 [a]

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

4.2.7. Avaliação das diferentes pectinases nos extratos enzimáticos brutos maximizados

No extrato enzimático bruto maximizado de cada pectinase específica (exo-PG, PMGL e PME) avaliou-se também as atividades pectinolíticas das outras 2 enzimas.

O extrato enzimático bruto da exo-PG (52,79 U/mL) produzido em condição maximizada (pectina cítrica -32 g/L, extrato de levedura -10 g/L, sulfato de magnésio - 0,5 g/L, pH - 5,5, 180 rpm, 30°C, 48 horas), apresentou atividade das enzimas PME e PMGL de 6,0 e 6,61 U/mL, respectivamente. No entanto, o extrato enzimático maximizado bruto (33 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio nas condições de 180 rpm, 30°C, 72 horas e $pH_{inicial}$ 5,5) da PMGL (9,0 U/mL) apresentou atividade PME de 3,20 U/mL e não apresentou atividade enzimática de exo-PG. O extrato enzimático bruto da PME (4,80 U/mL) produzido,

também, em condições maximizadas de bioprodução (32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro (II), $5x10^6$ esporos/mL, 30°C, $pH_{inicial}$ 5,5 e 27 horas), a atividade da PMGL foi de 2,96 U/mL e a exo-PG não apresentou atividade enzimática.

Segundo Antunes *et al.* (2006), a atividade da PME deve preceder a atividade da PG uma vez que a PME tem a função de desmetilar e preparar a cadeia poligalacturônica para a ação da PG despolimerizando-a. Após a ação da PG, cadeias pécticas ainda não desmetiladas são expostas e podem sofrer, ainda que em menor quantidade, a ação da PME. A atuação da PME desmetilando as pectinas se faz necessária uma vez que a PG se torna inativa na presença de grupos metílicos (Anthon *et al.,* 2002; Bicalho *et al.,* 2000; Evangelista *et al.,* 2000).

Desta forma, os resultados apresentados acima comprovam que a composição do meio de produção das pectinases e as condições operacionais influenciam na atividade pectinolítica, sendo necessário um meio otimizado especifico para cada pectinase bioproduzida.

4.2.8. Potencial de aplicação das pectinases em suco de pêssego

Os extratos enzimáticos brutos das enzimas exo-PG, PMGL e PME utilizados nos tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente, foram os obtidos em condições maximizadas de bioprodução de cada enzima. As pectinas, quando em solução aquosa, podem tornar o meio mais viscoso, mesmo quando em baixas concentrações, dependendo do seu grau de metoxilação (Lofgren & Hermansson, 2007). O tratamento enzimático de degradação da pectina ocasionaria redução na capacidade de retenção de água, portanto, mais água livre é liberada para o sistema, reduzindo a viscosidade dos sucos (Sandri *et al.,* 2011), como pode ser observado na Tabela 40. As máximas reduções da viscosidade do suco de pêssego foram de aproximadamente 12 e 7 %, onde empregou-se o tratamento enzimático com o extrato enzimático bruto da exo-PG e PME na concentração de 0,5 % (v/v), respectivamente. Ressaltando que o extrato bruto da PMGL não apresentou ação na redução da viscosidade.

Santin *et al.* (2008) avaliou a viscosidade de suco de pêssego com pectinase comercial, Pectinex AFPL-3 (Novozymes), nas condições de 45°C, 30 minutos e concentração da enzima de 200 ppm, obtendo uma redução de viscosidade de 29,7 %. Este resultado é considerado razoável uma vez que a enzima comercial Pectinex já contém certa quantidade de celulases, sendo provavelmente suficiente para melhorar a

extração de suco e retenção de polpa, e a adição de mais celulase não afetaria o desempenho do processo (Clemente & Pastore, 1998; Vámos - Vigyázó, 1981).

Tabela 40 – Redução de viscosidade do suco de pêssego após o tratamento enzimático.

Redução da viscosidade (%)*				
	Tratamentos Enzimáticos			
Tratamentos	***0,01 % (v/v)***	***0,05 % (v/v)***	***0,1 % (v/v)***	***0,5 % (v/v)***
1	$3,00 \pm 0,03^{C}$	$6,54 \pm 0,24^{B}$	$5,04 \pm 0,30^{B}$	$11,66 \pm 0,12^{A}$
2	-	-	$0,40 \pm 0,01^{A}$	$0,24 \pm 0,01^{B}$
3	$5,65 \pm 0,74^{C}$	$4,42 \pm 0,20^{D}$	$5,93 \pm 0,01^{B}$	$7,20 \pm 0,20^{A}$

* Média ± desvio padrão seguido de letras iguais/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

Na Tabela 41 é apresentada a ação da hidrólise enzimática sobre as substâncias pécticas e seu efeito na redução da turbidez. A maior porcentagem de redução da turbidez foi verificada no tratamento enzimático da exo-PG e PME na concentração de 0,5 % (v/v) com redução, para ambas, de aproximadamente 14 %. Fato que pode ser explicado, pois as pectinases hidrolisam a pectina, levando à floculação de complexos pectina-proteína (Lee *et al.,* 2006), resultando em sucos com reduzido teor de macromoléculas e menor turbidez (Sandri *et al.,* 2011).

Tabela 41 – Redução de turbidez do suco de pêssego após o tratamento enzimático.

Redução da Turbidez (%)*				
	Tratamentos Enzimáticos			
Tratamentos	***0,01 % (v/v)***	***0,05 % (v/v)***	***0,1 % (v/v)***	***0,5 % (v/v)***
1	-	$8,91 \pm 0,01^{C}$	$12,38 \pm 0,18^{B}$	$13,71 \pm 0,01^{A}$
2	-	-	-	$6,26 \pm 0,26$
3	$0,08 \pm 0,14^{D}$	$4,85 \pm 0,53^{C}$	$11,96 \pm 0,08^{B}$	$14,11 \pm 0,28^{A}$

*Média ± desvio padrão seguido de letras iguais/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

Na Tabela 42 é apresentada a ação hidrolítica das preparações pectinolíticas em teste sobre as substâncias pécticas e seu efeito na clarificação do suco. Há uma relação direta entre a redução da turbidez com o aumento da clarificação, sendo que na concentração de 0,5 % da exo-PG obteve-se a maior redução de turbidez (14 %) e consequentemente maior clarificação (27 %). Este efeito também foi constatado por Lee *et al.* (2006) e Abdullah *et al.* (2007). Ressalta-se que a maior eficácia do extrato enzimático bruto da exo-PG na clarificação, na redução da turbidez e viscosidade, possivelmente esteja relacionada ao fato do extrato enzimático bruto maximizado desta enzima, apresentar também atividade de PME de 6 U/mL e PMGL de 6,61 U/mL.

Assim, é possível que os resultados obtidos tenham sido influenciados por estas enzimas e outras, cujas atividades não tenham sido determinadas no estudo. Corroborando com os resultados relatados por Clemente & Pastore, (1998) e Vámos – Vigyázó (1981), empregando enzima comercial Pectinex a qual também apresentava atividade de celulases, melhorando desta forma o desempenho do processo de clarificação do suco de pêssego quando comparado com as enzimas isoladas.

Tabela 42 – Clarificação do suco de pêssego após o tratamento enzimático.

Clarificação (%)*				
	Tratamentos Enzimáticos			
Tratamentos	***0,01 % (v/v)***	***0,05 % (v/v)***	***0,1 % (v/v)***	***0,5 % (v/v)***
1	0,06 ± 0,01 ^{D}	3,80 ± 0,01 ^{C}	14,78 ± 0,54 ^{B}	26,92 ± 0,16 ^{A}
2	-	0,95 ± 0,01 ^{A}	0,43 ± 0,01 ^{B}	-
3	-	0,03 ± 0,01	-	-

* Média ± desvio padrão seguido de letras iguais/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

A Tabela 43 apresenta os valores de pH e sólidos solúveis (ºBrix) do suco tratado enzimaticamente. Pode-se observar que os tratamentos enzimáticos e o tempo de reação (60 minutos) não influenciaram os valores de pH e sólidos solúveis sendo próximos aos obtidos com o suco *in natura*. Isto também foi verificado com suco de umbu (Ushikubo *et al*., 2007), tamarindo (Watanabe, 2007) e abacaxi (Barros *et al.,* 2003).

Tabela 43 - Valores de pH e sólidos solúveis (°Brix) do suco de pêssego após o tratamento enzimático.

pH*				
	Tratamentos Enzimáticos			
Tratamentos	***0,01% (v/v)***	***0,05 % (v/v)***	***0,1% (v/v)***	***0,5% (v/v)***
Suco controle	3,67 ± 0,02 ^{A}	3,67 ± 0,02 ^{A}	3,69 ± 0,01 ^{A}	3,68 ± 0,02 ^{A}
1	3,67 ± 0,03 ^{A}	3,69 ± 0,01 ^{A}	3,67 ± 0,01 ^{A}	3,69 ± 0,01 ^{A}
2	3,68 ± 0,01 ^{A}	3,68 ± 0,01 ^{A}	3,66 ± 0,01 ^{A}	3,70 ± 0,01 ^{A}
3	3,66 ± 0,03 ^{A}	3,68 ± 0,01 ^{A}	3,68 ± 0,01 ^{A}	3,69 ± 0,01 ^{A}
Sólidos solúveis (ºBrix)*				
	Tratamentos Enzimáticos			
Tratamentos	***0,01% (v/v)***	***0,05 % (v/v)***	***0,1% (v/v)***	***0,5% (v/v)***
Suco controle	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}
1	13,00 ± 0,10 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}
2	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}
3	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}	13,00 ± 0,01 ^{A}

* Média ± desvio padrão seguido de letras iguais/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 5 %.

4.2.9.Considerações finas

De acordo com os resultados apresentados, a estratégia de isolamento de micro-organismos com potencial pectinolítico, bem como a seleção dos melhores produtores mostrou-se eficiente, obtendo-se expressivas atividades pectinolíticas (exo-PG, PMGL e PME) em fermentação submersa usando meio complexo, empregando-se a ferramenta de planejamento de experimentos na otimização das variáveis de meio de cultivo e das condições operacionais. A caracterização parcial (pH e temperatura ótimos, estabilidade a temperatura e pH) das enzimas (exo-PG, PMGL e PME) permite direcionar o potencial de futuras aplicações das mesmas. Ressaltando, que em ensaio prévio de aplicação destes extratos enzimáticos brutos em suco pêssego comercial demonstraram que a exo-PG possui uma maior eficiência de ação na clarificação do suco.

Estes resultados são importantes, tendo em vista a escassez de publicações na literatura, principalmente no que se refere a produção da enzima PME a partir de micro-organismos (sendo a maioria extraídos de plantas e derivados). Além disso, apresenta como vantagem a diminuição da dependência externa com as importações destas enzimas, pois a grande maioria das enzimas pectinolíticas consumidas pela indústria brasileira são importadas e o consumo interno e grande, porém, o mercado potencial de produção é muito grande considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de sucos do mundo e significante produtor de bebidas, tais como vinhos, como destacado anteriormente, mercado este potencial para enzimas pectinolíticas.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho foi estudado a bioprodução de pectinases (exo-PG, PMGL, PME, PGL e PE) a partir de micro-organismos isolados de amostras de resíduos agro-industriais, solos e produtos em decomposição, empregando-se a técnica de planejamento de experimentos. Além disso, propôs-se a caracterização parcial visando a potencialidade de aplicações. A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

- ✓ Um total de 108 micro-organismos foram utilizados no estudo exploratório da bioprodução de exo-poligalacturonases. Destes micro-organismos, 16 eram de linhagens obtidas de bancos de cepas, 76 fungos filamentosos e 16 bactérias isolados e selecionados de diversas amostras (solo, frutas, folhas, produtos em decomposição, etc.). Foi possível selecionar micro-organismos (*A. niger* ATCC 16404, *A. niger* ATCC 1004, *A.niger* ATCC 9642, *P. putida*, W12(F), D2(F), H8(F), L1(F), K3(B), G6 (B), W35(F), W43(F), W44(F), W52(F), W23(F), W24(F), H9(F), B9(F), J6(F), W18(F), L4(F) e T2(F)) potenciais produtores de exo-poligalacturonase. O micro-organismo de maior produção pectinílitica codificado como D2 foi identificado como sendo *Penicillium brasilianum.*
- ✓ Um planejamento completo de segunda ordem possibilitou a maximização da bioprodução de exo-PG por *Penicillium brasilianum* em frascos agitados obtendo-se um teor de 52,79 U/mL, com concentração de 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 30°C, 180 rpm, 48 horas e $pH_{inicial}$ 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL. Em biorreator obteve-se atividade de exo-PG máxima de 53,87 U/mL, com 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 30°C, 180 rpm, 1,5 v/v, 36 horas e $pH_{inicial}$ 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL.
- ✓ A caracterização parcial do extrato enzimático bruto de exo-PG apresentou condições de pH e temperatura ótimos de 4,5 e 40°C, respectivamente. A maior estabilidade foi obtida em pH 5,0 e temperaturas de 55°C e -80 °C de armazenamento. A energia de ativação (Ed) para a reação de desativação foi de 5,76 kJ mol^{-1}, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 693,10 horas.
- ✓ A maximização da produção de PMGL por *Penicillium brasilianum* em frascos agitados foi de 9,0 U/mL em meio de bioprodução composto de 33 g/L de

pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio nas condições de 180 rpm, 30°C, 72 horas, $pH_{inicial}$ 5,5 e $5x10^6$ esporos/mL.

- ✓ A caracterização parcial do extrato enzimático bruto da PMGL apresentou condições de pH e temperatura ótimos de 5,5 e 37°C, respectivamente. Em relação a estabilidade, nas temperaturas de -80, -10 e 4°C, o extrato enzimático bruto manteve por 768 horas, 41, 46 e 56 % de sua atividade residual, respectivamente. No entanto, em altas temperaturas (30 a 70°C) em 768 horas e em diferentes pH (3 a 8) em 312 horas manteve -se estável, com atividade residual maior que 50 %.
- ✓ Um planejamento completo de primeira ordem possibilitou a maximização da bioprodução da PME por *Penicillium brasilianum* em frascos agitados obtendo-se um teor de 4,8 U/mL com 32 g/L de pectina, 30 g/L de extrato de levedura, 8 g/L de fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro, $5x10^6$ esporos/mL, 30°C, 27 horas, $pH_{inicial}$ 5,5 e 180 rpm.
- ✓ Empregando coadjuvante de medida de atividade de PME, o sal $CaCl_2$ a 0,5 M e 0,5% de pectina cítrica permitiu um incremento de 2,3 vezes na atividade.
- ✓ A caracterização parcial do extrato da PME indicou maior atividade (36 a 40 U/mL) em pH ótimo de 9 a 11 e em uma ampla faixa de atuação da temperatura, 30 a 80°C. Em relação a estabilidade, nas temperaturas menores de 4°C o extrato enzimático bruto reteve cerca de 80 % de sua atividade residual em 888 horas de armazenamento. No entanto, em altas temperaturas foi verificado um acréssimo na atividade enzimática (~15 %). Nos diferentes pH (5, 7, 9 e 11) o extrato enzimático bruto manteve-se estável por um período de 816 horas.
- ✓ Os extratos enzimáticos pectinolíticos brutos (exo-PG, PMGL e PME) produzidos pelo micro-organismo *Penicillium brasilianum* apresentam potencialidades de aplicação na indústria de sucos. No suco de pêssego, ao empregar tratamento enzimático com 0,5 % (v/v) de extrato enzimático bruto da exo-PG, a 40°C durante 60 minutos, foi verificada a maior eficácia na redução de viscosidade (12 %), turbidez (14 %) e na clarificação (27 %).

Através da experiência adquirida neste trabalho acerca da bioprodução de pectinases (exo-PG, PMGL, PME, PGL e PE), empregando-se técnica de planejamento de experimentos, da caracterização parcial visando a potencialidade de aplicações, pode-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

- ✓ Aumentar a escala de produção das pectinases (Pectina liase e pectinametilesterase) utilizando biorreator.
- ✓ Avaliar a bioprodução das pectinases em fermentação submersa e sólida, utilizando substratos agroindustriais.
- ✓ Desenvolver estudos de purificação dos extratos enzimáticos brutos.
- ✓ Imobilizar as enzimas pectinolíticas em diferentes suportes orgânicos e/ou inorgânicos (carvão vegetal, acurel, alginato, argila, entre outros.), visando potencial de aplicação e reutilização.
- ✓ Avaliar potencial de aplicação das pectinases em diferentes setores (têxtil, alimentos, bebidas, etc).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, L. A.G.; SULAIMAM, N.M.; AROUA, M.K.; NOOR, M.M. M.J. Response surface optimization of condition for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. Journal of Food Engineering, 81 (1): 65-71, 2007.

AMARAL, S. H.; ASSIS, S.A.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial Purification and Characterization of Pectin Methylesterase From Orange (*Citrus Sinensis*) Cv. Pera-Rio. Journal of Food Biochemistry 29, 367–380, 2005.

ANTHON, G. E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N. *et al.* Thermal inactivation of pectin methylesterase, polylagacturonase, and perosidase in tomate juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6153-6159, 2002.

ANTUNES, L.E.C.; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (Rubus spp.) durante o armazenamento. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, 12, (1), 63-66, 2006.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: A review. Process Biochemistry, 33, (1), 21- 28, 1998.

AQUINO, L. Produção de pectinase e lípase a partir de um agente biológico. FAPEMIG. Instituto Inovação. Disponível em: http://www.institutoinovacao.com.br/downloads/Producao_enzimas.pdf. Acesso em 20/10/2007.

AQUINO, A. C. Eficiência da maceração enzimática da polpa de Bacuri (Platonia insingnis Mart.). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará como requisito a obtenção do grau de mestre. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

AYERS, W. A.; PAPAVIZAS, G. C.; DIEM, A. F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani.* Phytopatol., 56, 1006-1011, 1966.

ARBAISAH S. M.; ASBI, B. A.; JUNAINAH A. H.; JAMILAH B. Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. Food Chemistry 59 (1), 33-40, 1997.

ASSIS, S. A.; FERREIRA B. S.; FERNANDES, P.; GUAGLIANONI, D.G., CABRAL J.M.S., OLIVEIRA, O.M.M.F. Gelatin-immobilized ectinametilesterase for production of low methoxyl pectina. Food Chemistry 86 (3), 333-337, 2004.

ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; QUAGLIANONI, D.G.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial Purification and Characterization of Pectina Methylesterase from Acerola (*Malpighia glabra* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 4103–4107, 2002.

ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinamethylesterase, pectina content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. Food Chemistry 74, 133–137, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the association of the analytical chemists, 16 ed. Washington, 1995.

BAILEY, M.J.; & PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. Enzyme Microb. Technol. 12: 266-271, 1990.

BAKER, R.A.; CAMERON, R.G. Clouds of citrus juices and drinks. Food tecnol. 53, (1), 64-69, 1999.

BARACAT, M.C, VALENTIM, C., MUCHOVEJ,J.J., SILVA,D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. Biotechnol. Lett. 11, 899-902, 1989.

BARROS, S. T. D.; ANDRADE, C. M. G.; MENDES, E. S.; PERES, L. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. Journal of Membrane Science, Amsterdam, 215 (1-2), 213-224, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. 2ª ed., Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.

BARNETT, H. L., BARRY, B. AND HUNTER, B. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society, New York, USA. (1998).

BLANDINO, A., IQBALSYAH, T., PANDIELLA, S.S., CANTERO, D., WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 164–169, 2002.

BEHERE, A., SATYANARAYAN, V., PADWAL-DESAI, S.R., Separation and limited characterization of three polygalacturonases of *Aspergillus niger*. Enzyme Microb. Technol. 15, 158–161. 1993.

BENEN, J.A.; VISSER, J. Poygalacturonases. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. e Wong, D.W.S., Editors, 2003. Handbook of food enzymology, 69, 857-866, 2003.

BICALHO, U. de O. Vida útil pós-colheita de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de PVC. Lavras, 145p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2000.

BOAS, E.V.B.; CHITARRA A.B.; MALUF, W.R.; CHITARRA, M.I.F. Modificações

Texturais de tomates Heterozigotos no Loco *Alcobaça*. Pesquisa Agrapecuária Brasileira, 35 (7), 1447, 2000.

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, 42 (1), 98-101, 2007.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L.; Ciênc. Agrotec. 24, 137, 2000.

BRUMMELL, D. A. et al. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. Journal of Experimental Botany. v. 55, n.405, p.2029-2039, 2004.

CAMARGO, L A.; DENTILLO, D.B.; CARDELLO, L.; GATTÁS, E.A.L. Utilization of orange bagasse in pectinases production by *Aspergilllus* sp. Alim. Nutr., Araraquara, 16 (2), 153-156, abr./jun. 2005.

CARDENAS, F., ALVAREZ, E., CASTRO-ALVAREZ, M.S., SANCHEZMONTERO, J.M., VALMASEDA, M., ÉLSON, S.W., SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14, 111-123.2001.

CARDELLO, L., & LOURENÇO, E. J. Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from egg plant. Alim. Nutr., São Paulo, 4, 111-123, 1992.

CARVALHO, H.A.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA A.B.; CARVALHO, H.S. Efeito da Atmosfera Modificada sobre Componentes da Parede Celular da Goiaba. Ciênc. agrotec., 25 (3), 605-615, 2001.

CARVALHO, E. A. - Caracterização de pectinases obtidas a partir dos resíduos industriais da polpa do abacaxi (Ananas comosus L. Merr) cv. Pérola. Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – Brasil, 2007.

CASTILHO L.R., MEDRONHO R. A., ALVES T. L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource Technology 71, 45-50, 1999.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B.P. GUHA, A.P. Clarification of fruit juice with chitosan. Process Biochemistry, 39, 2229- 2233, 2004.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and Polyphenoloxidase, the Importace for Food Technology. Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 32 (2), 167- 171, Set./Dez. 1998.

CORDEIRO, C. A. M., MARTINS, M.L.L. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme; Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29(1), 135-141, 2009.

CORREIA, A. A. DA Silva; Maceração enzimática da Polpa de Noni (Morinda citrifolia L.). Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Área de atuação: Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza – CE, 2010.

COSGROVE, D.J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants, Annu Ver Cell Dev. Biol. 13, 171-201, 1997.

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 36, 255–261, 2000.

COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. 198f. Tese (Doutorado em Ciências). Pós-graduação em Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1993.

CHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechonology Advances, 19, 627-662, 2011.

CHIN, L-H.; MOHD.ALI, Z.; LAZAN, H. Cell wall modification, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. Journal of Experimental Botany. 50 (335),767-775, june 1999.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE, 320, 2000.

de CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S., Biocatálise: Avanços recentes. Química Nova, 24 (5), 2001.

DAMAK N., TAIEB N.H, BONNIN E., BACHA A. B., GARGOURI A. Purification and biochemical characterization of anovel thermo active fungal pectate lyase from *Penicillium occitanis.* Process Biochemistry, 2011.

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; BILIBIO, D.; SILVEIRA, M. M. E COSTA, J. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation. *Z. Naturforsch*, 57, 666-670, 2002.

DENÈS, J.M.; BARON, A.; RENARD, C.M.G.C.; PÉAN C; DRILLEAU, J.F. Differentes action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7,0 and 4,5. Carbihydr. Res., 327, 393-395, 2000.

DINU, D. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, UK, 6 (5), 397 - 402, 2001.

DOWNIE, B.; DIRK, L.M. A.; HADFIELD, K.A.; WILKINS, T.A.; BENNETT A.B.; BRADFORD, K.J. A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. Anal. Biochem., 264,149-157, 1998.

EL-REFAI, A.A.; METWALLI, S. M.; EL-SABAIY, L.A. Influence of pH, inoculum concentration, aeration and growth period on production of pectolytic enzymes by *Aspergillus amamori* 16. Chemistry Microbial Technology, New York, 8, 115-117, 1984.

EVANGELISTA, R.M.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Influência da aplicação pré-Colheita de cálcio na textura e na atividade das enzimas Poligalacturonase, Pectinametilesterase e galactosidase de mangas 'Tommy Atkins' armazenadas sob refrigeração. Ciênc. agrotec., v.24 (Edição Especial),174-181, dez., 2000.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A.; Int. Biodeterior. Biodegr. 52, 223, 2003.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIM, A.C.R., CHAVES-ALVES, V. M., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O., ARAUJO, E.F. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansun*. Rev.Microbiol. 27,15-18, 1996.

FILL, T. P. Estudos biossintéticos de amidas bis-fenilpropanoídricas produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum*, um endofítico de *Milia azedarach* (meliaceae). Dissertação de mestrado, Departamento de Química/ UFSCAR, São Paulo – SP, 2009.

FONTANA, R.C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Comparation of stirred tank and airlift biorreactors in the production of polygalacturonases by *A. oryzae*. Bioresource Technology.100, 4493-4498, 2009.

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: CD. 2005.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. N.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of amylase by *Aspergillus oryzae*. Biochemical Engineering Journal. 15, 107-115, 2003.

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.

FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. Concomitant biosynthesis of *Aspergullus niger* pectolytic enzymes and citric acid on sucrose. Enzime Microbial Techonol. 16, 703-707, 1994.

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., 17, 145–148, 1997.

GARZO´N, C.G., HOURS, R.A., Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. Bioresourc. Technology. 39, 93–95; 1992.

GEÖCZE, M.L.A.; COELHO, J.L.C.; ARAÚJO, E.F.; SILVA, D.O. Effect of yeast extract and medium pH on polygalacturonase production by *Penicillium expansum*. Rev. Microbiol. 26, 165-168, 1994.

GODFREY, V., HYMAN, L. J., McMILLAN, G. P., PÉROMBELON, M. C. M. Purification and characterization of mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica strain SCRI 1043. Journal of Applied Bacteriology, 76, 13-21, 1994.

GOMES J., ZENI J., CENCE K., TONIAZZO G., TREICHEL H., VALDUGA E. Evaluation of production and characterization of poligalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642. Food and Bioproducts Processing, 2010.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, 30 (1), 136–145, 2007.

GONZALEZ, S.L., Determinação da atividade de Pectinametilesterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco de manga. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2009.

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 Microb. Technol. 32, 321–330. 2003.

HADJ-TAIEB N, Ayadi M, Trigui S, BouabdAllah F, Gargouri A. Enzyme Microb Technol. 30, 662, 2002.

HANGERMANN, A.E.; AUSTIN, P.J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl-esterase. J. Agric. Food Chem. 34, 440-444, 1986.

HENNIES, P. T. Produção de pectinases de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.

HILTIN, H. O.; LEVINE, A. S. Pectin methylesterase in the ripening banana. Journal of Food Science, 30, 917-921, 1966.

HOBSON, G. E. Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit. Biochemistry Journal. 86, 358-365, 1963.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 409–418, 2002.

HUBER, D. J.; KARAKURT, Y.; JEONG, J. Pectin degradation in ripening and wounded fruits. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13 (2), 224-241, 2001.

HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties. Journal of Food Science, Chicago, 31 (3), 320-327, 1966.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª ed., São Paulo, v1, 2005.

IANNETTA, P. P. M. et al. The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening. Physiologia Plantarum, 105, 338-347, 1999.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R.; Process Biochem. *40*, 2931, 2005.

JIA-PING LAI, YUE JIANG, XI-WEN HE, JUN-CHAO HUANG, FENG CHEN, Separation and determination of astaxanthin from microalgal and yeast samples by molecularly imprinted microspheres, Journal of Chromatography B, 804, 25–30, 2000.

JOLIE R. P, DUVETTER T, VAN LOEY A. M, HENDRICKX M. E. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review**.** Carbohydrate Research 345, 2583–2595, 2010.

JOHNSTON, J. W.; HEWETT, E. W.; HERTOG, M. L. A. T. M. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 30, 145-160, 2002.

JUSTEN, P.; PAUL, G.C.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. Biotechnol. Bioeng. 52, 672-684, 1996.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Appl. Sci. London, 217-225, 2000.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Boiresource Technology, 77, 215-227, 2001.

KAUR G., KUMAR S., SATYANARAYANA T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. Bioresource Technology 94, 239–243, 2004.

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 Microb. Technol. 29, 70–75. 2001.

KAWANO, Bruno Rógora; ZUPPARDO, B.; MOLINA, Silvia Maria Guerra; Cruz, S.H. Avaliação comparativa da produção de xilanases e pectinases por diferentes linhagens de fungos. In: ENZITEC, 2008. Anais do ENZITEC-2008, 2008.

KURTZMAN, C.; FELL, J. Yesat Systematics and Phylogeny: Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology In: PÉTER, G.; ROSA, C.

(Org). Biodivesity and Ecophysiology of Yeast, Berlin Heidelberg: Springer, 11-30, 2006.

LEE, W.C; YUSOF, S.; HAMID, N.S.A.; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice response surface methodology (RSM). Journal of Food Engineering, 73, 55-63, 2006.

LEE, J. M. Biochemical Engineering. Printice Hall, 1992.

LEITE, K. M.S.C.; TADIOTTI, A.C.; BALDOCHI, D.; OLIVEIRA, O.M.M.F.O. Partial purification, heat stability and kinetic characterization of the pectinmethylesterase from Brasilian guava, Paluma cultivars. Food Chemistry 94, 565-572, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p, 1995.

LIMA, A. R. S., Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Amazonas- UFAM, 2006.

LINDE, G. A.; MAGAGNIN. G.; COSTA, A. V.; BERTOLIN, T. E. B.; COLOUTO, N. B. Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid substrate cultivation. Brazilian Journal of Microbiology, 38, 557-562, 2007.

LOFGREN, C. & HERMANSSON, A.M. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. Food Hydrocolloids, 21: 480-486, 2007.

LOHANI, S.; TRIVEDI, P.K.; NATH, P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. Postharvest Biology and Technology 31, 119-126, 2004.

LOURENÇO, E. J.; CATUTANI, A. T. Purification and properties of pectinesterase from papaya. Journal of the Science of Food and Agriculture, 35, 11201, 127, 1984.

LY-NGUYEN, B.; LOEY, A.V.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; DUVETTER, T.; VU, S.T.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M.E. Strawberry Pectin Methylesterase (PME): Purification, Characterization, Thermal and High-Pressure Inactivation Biotechnol. Prog. 18 (6), 2002.

MALAJOVICH, M.A. Biotecnologia. Rio de Janeiro: Axcel Books, 344 p. 2004.

MALLER, A. Produção**,** purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, programa de pós-graduação em bioquímica, departamento de bioquímica e imunologia. Ribeirão Preto, 2008.

MANACHINI, P. L.; PARINI, C.; FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aereobasisium pullulans* LV 10. Enzyme Microb. Technol. 10 (11), 682-685, 1998.

MÁRQUEZ-ROCHA, F.J.; GUILLÉN, G.K.N.; SÁNCHEZ, J.E.V.; VÁSQUEZ-DUHALT, R. Growth characteristics of *pleurotus ostreatus* in biorreactors. Biotechnology Techniques. 13, 23-32, 1999.

MARTINS E. S.; *et al,*. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. Antonie Leew. 91, 291–9, 2007.

MARTINS, N., *et al,*. Estudo do Tempo de Cultivo na Produção de Pectinases por *Penicillium* sp EGC5 e *Moniella* sp 9SB em Fermentação Semi-Sólida (FSS) de Resíduos Agrícolas. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"-UNESP. Instituto de Biociências, Rio Claro- SP. 2006.

MARTINS, E.S., SILVA, D., DA SILVA, R., GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochemestry, 37, 949–954, 2004.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; da SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus.* Process Biochem, 37 (9), 949-954, 2002.

MENEZES, C. S. Purificação e caracterização parciais de pectina liase de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 30p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MERCHUK, J. C. & SIEGEL, M. H.. Air-lift reactors in chemical and biological technology. J. Chem. Tech. Biotechnol. 41, 105-120,1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, 31, 426-428, 1956.

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, 14 (4), 755-761, 1992.

MOHAMED, S.A; FARID, N.M.; HOSSINY, E.N.; BASSUINY, R.I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. J. Biotechnol., 127(1), 54-64, 2006.

MOHAMED, S.A., CHRISTENSEN, T.M.I.E., MIKKELSEN, J.D., New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their

specificities to partially methylated and acetylated pectins. Carbohyd. Res. 338, 515–524, 2003.

MOLINA, S. M. G.; PELISSARI, F.; VITORELLO, C. B. M. Screening and genetic improvement of pectinolytic fungi for degumming of textile fibers. Brazilian Journal of Microbiology, 32, 320-326, 2001.

MORAN, F., NASUNO, S., STAN, M.P. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminase of *Erwinia carotovora*. Arch. Biochem. Biophysic, 123, 298-306, 1968.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 16 (1), 57-67, 2003.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Performance of pectolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. Enzyme Microb. Technol., 25 (1-2), 116-124, 1999.

NITURE S. K., KUMARB A. R., PARABC P. B., PANTA A., Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. Microbiological Research 163, 51—62, 2008.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium Moniliforme*. Microbial Research, Jena, 159 (3), 305-314, 2004.

OLIVEIRA, F. E. R., *et al.* Firmeza de pêssegos 'Diamante' tratados com 1-MCP. Revista Brasileira de Fruticultura, 27 (3), 366-368, Dezembro, 2005.

ORTEGA, N., *et al.,* Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. Food Chemistry, 88, 209–217, 2004.

OUATTARA H.G., REVERCHON S., NIAMKE S. L., NASSER W. Molecular identification and pectate lyase production by Bacillus strains involved in cocoa fermentation. Food Microbiology 28, 1-8, 2011.

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. Anais In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianopólis. 2003.

PAULA, E. M. Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*coffea arábica* L.). Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2001.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science, 77, 149-162, 1999.

PARINI, C., FORTINA, M. G., MANACHINI, P. L. Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV 10. Journal of Applied Bacteriology, 65, 477-481, 1988.

PATIL S.R., DAYANAND A. Production of pectinase from deseeded sunXower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. Bioresource Technology 97, 2054–2058, 2006.

PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arábica L.)* colhido em quatro estágios de maturação. Ciência Agrotecnica, Lavras, 24 (4), 1079-1083, 2000.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. Revista de Química Industrial, 74, 17-20, 2006.

PITT, M., Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: Methods Enzymol. 161, 350-354, 1988.

PICCOLI-VALLE, R. H.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. Braz. J. Microbiol, 32 (2), 135-140, 2001.

PHUTELA, U; DHUNA, V; SANDHU, S E.; CHADHA, B. S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposting orange peels. Braz. J. Microbiol, 36 (1), 63-69, 2005.

PRASANNA, *et al.* Pectic polysaccharides during ripening of mango (*Mangifera indica* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 1182-1186, 2003.

QUIROGA EMMA N., SGARIGLIA MELINA A., MOLINA CÉSAR F., SAMPIETRO DIEGO A, SOBERÓN JOSÉ R., VATTUONE MARTA A. - Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*- mycological research, 113, 1404-1410, 2009.

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 22 (2), 206-212, 2004.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

ROEDER, V. and BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Applied Microbiology,* 1, 17-20, 1987.

RHOLF, F. J. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. *Exeter Software:* New York; 1992.

ROMBOUTS, F.M; VERSTEEG, C. KARMAN, A.H.; PILNIK,W. Pectinesterases in component parts of citrus fruits related to problems of cloud loss and gelation in citrus products. In Use of Enzymes in food technology. Proceedings Of Iternational Symposium; Dupuy, P., Ed. Versailles, France; p.483-487, 1982.

ROSSI, R.J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V.L. Inoculum production of the ectomycorrhyzal fungus *pisolithus microcarpus* in na airlift biorreactor. App. Microbiol. Biotechnol, 59, 175-181, 2002.

SAINZ, RICARDO LEMOS, OLIVEIRA, CRISTIANE FABRES DE; VENDRUSCOLO, JOÃO LUIZ SILVA, ANTUNES, PEDRO L., BENDER, Carolina Irigoyen. Poligalacturonase e pectinametilesterase em pêssegos [Prunus pérsica (L.) Batsch] cv. Eldorado, 2007.

SALES, A. N. de; BOTREL, N.; COELHO, A. H. R. Aplicação de 1-metilciclopropeno em banana 'prata-anã' e seus efeitos sobre as substâncias pécticas e enzimas pectinolíticas. Ciência e Agrotecnologia, 28 (3), 479-487, maio/jun., 2004.

SANDRI, I.G., FONTANA, R.C., BARFKNECHT, M., MOURA DA SILVEIRA, M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases, LWT - Food Science and Technology. Doi: 10.1016/ j.lwt. 2011.02.008, 2011.

SANDRI, I. G. Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em biotecnologia da universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção à obtenção do grau de doutor em biotecnologia. Caxias do Sul, 2010.

SANTI, L. Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de

mestrado (Programa de Pós-graduação em Biologia celular e molecular) UFRGS, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, 2005.

SANTIN, M. M.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H. ; CABRAL, L.; LUCCIO, M. Di. Evaluation of enzymatic treatment of peach juice using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 507-512, 2008.

SANTOS, S. F. M. , Macedo G. R. , Silva F. L. H. , Souza R. L. A. e Pinto G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. Químca. Nova, 31 (8), 2008.

SANTOS, S. F. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado em engenharia química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, Rio Grande do Norte, 2007.

SATHYNARAYANA, N. G.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbiol pectinases – a review. Process Biochemistry, 38, 987-996, 2003.

SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial. V. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

SCHMIDELL, W. & FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, V. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. Biotecnologia Industrial. Edgard Blucher LTDA. 2, 277-331, 2001.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, capítulo 1, p. 85-95, 1996.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. Process Biochemistry, 40, 285-289, 2007.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Journal of Microbiology, Sao Paulo, 33 (4), 318-324, Oct/Dec, 2005.

SILVA, D; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Braz. J. Microbiol, 33 (4), 318-324, 2002.

SILVA, D.O., ATTWOOD, M.M., TEMPEST, D.W. Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, 574-578, 1993.

SOARES, M. M. C. N.; DA SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17, 79-82, 2001.

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, 30 (4), 299-303, 1999.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Sci. Bull, 38, 1409-1438, 1958.

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, 41, 36-41, 1993.

SOUZA, Rosane L. A. de; OLIVEIRA, Líbia de S. C.; SILVA, Flávio L. H. da e AMORIM, Beatriz C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. Rev. bras. eng. agríc. Ambient, 14 (9), 987-992, 2010.

SOUZA R. L.A., Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Campina Grande, 2008.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. *Principles of fermentation technology*, 2. ed., Butterworth Heinemann, 2000.

SHULER, M.L. & KARGI, F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. New York: Prentice Hall, 2002.

TANNER, H. & BRUNNER, H.R. Getranke anlytic – untersuchungsmethode fur dia Labor- und Betriebspraxis. Wadesnwill: Verlang Helles, 1985.

TARI C, GOGUS N, TOKATLI F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. Enzyme Microb Technol, 40, 1108–1116, 2007.

TARI CANAN, DOGAN NERGIZ, GOGUS NIHAN - Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae* - Food Chemistry 111, 824–829, 2008.

TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, J. L.; DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. Braz. J. Microbiol., 31 (4), 286-290, 2000.

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, Florianópolis, 2003.

TERMOTE F.; ROMBOUTS F.M.; PILNIK, W. Stabilization of cloud in pectinesterase active orange juice by pectic acid hydrolysates. Journal of Food Biochemistry 1, 15–34, 1977.

TREVAN, M.D. *et al.* (Ed.). Biotecnología: principios biológicos. Zaragoza: Acribia, 1990.

TRESKATIS, S.K.; ORGELDINGER, V.; WOLF, H.; GILLES, E.O. Morphological characterization of filamentous microrganismn in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. Biotechnol. Bioeng. 53-191-201, 1997.

TRIBESS, T. B. Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TRINDADE, V.; DANIEL, M. R.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: V Seminário de hidrólise enzimática de biomassas, 1996, Maringá. Anais. CD, 1996.

TSUYUMU, S., FUNAKUBO, T. Purification and partial characterization of a mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia chrysanthemi* strain EC 183. Physiological Plant Pathology, 27, 119-130, 1985.

UEDA, S.; YUSAKU, F.; LIM, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. Journal Appliet Biochemical, 4, 524-532, 1982.

UENOJO, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

UENOJO, M.; PASTORE, Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives; Química. Nova, 30 (2), 2007.

USHIKUBO, F. Y.; WATANABE, A. P.; VIOTTO, L. A. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberose* Arr. Cam.) juice. Journal of Membrane Science, Amsterdam, 288 (1-2), 61-66, 2007.

USTOK F. I., TARI C., GOGUS N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 Journal of Biotechnology 127, 322–334, 2007.

VALLE, ANY B.F. & VASCONCELLOS, ANA M.. Cursos práticos em bioquímica. Departamento de bioquímica – Instituto de química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J.F.; HOURS, R.A.; CASCONE, O. Spectrophotometric Method for Fungal Pectinesterase Activity Determination. Technol. Argentina, 26, 107-110, 1993.

VÁMOS – VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidade and peroxidase in fruits and vegetables. Central Food Research Institute, semptember, Budapest, Hungary, p. 49- 127, 1981.

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.

VRIES, R. P., VISSER Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Resource*, USA , v. 327, p. 401 - 410, 2000.

WANG Y. , WANGA Z., XU Q., DUA G., HUA Z., LIU L., LI J. , CHEN J., Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant Pichia pastoris Process Biochemistry, 44, 949–954, 2009.

WATANABE, A. P. Microfiltração de suco de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) por membrana polimérica: efeito do tratamento enzimático, da velocidade tangencial e da pressão transmembrana. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535, 1990.

WHITAKER, J.R. Pestic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. Enzyme Microbial Technol, 6, 341-347, 1984.

WHITAKER, J. R. Microbial Enzyme and Biotechnology. 2. ed., New York: Elsevier, 363 p., 1990.

WONG, D.W.S. Food enzymes Structure and Mechanism. Ed. Chapman & Hall, New York, 1995.

YADAV S, YADAV P.K., YADAV D., YADAV K.D.S., Pectin lyase: A review. Process Biochemistry, 44, 1–10, 2009.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. Process Biochemistry, 33 (8), 323-329, 2000.

7. APÊNDICES

APÊNCIDE I

Tabela 44 - Atividade da exo- PG (µmol/mL/min) durante as 96 horas de fermentação para os 108 micro-organismos testados.

Micro-organismos	24h	48h	72h	96h
Identificados				
P. *variotii* ATCC 22319	0,92±0,00fg	0,99±0,01i	0,44±0,01j	0,34±0,03h
P. putida	0,22±0,00ij	3,17±0,01b	2,29±0,01d	1,69±0,00c
A. niger ATCC 9642	1,26±0,02e	0,26±0,00m	0,31±0,01jl	0,00±0,01j
P.camembertii ATCC 4845	2,37±0,01c	2,42±0,02de	1,49±0,02fg	1,31±0,01d
A. niger ATCC 16404	3,65±0,09ab	3,20±0,07b	2,99±0,07a	2,91±0,10a
A. niger	2,78±0,07bc	0,71±0,02ij	0,41±0,03j	0,31±0,05h
A. niger ATCC 1004	4,16±0,11a	2,43±0,04de	1,70±0,03f	1,69±0,00c
A. niger ATCC 9642	3,27±0,23b	2,22±0,04e	1,43±0,02fg	1,08±0,08e
P.notatum ATCC 9478	2,85±0,04b	2,36±0,02de	1,48±0,04fg	0,83±0,03f
P. duclauxii ATCC 9121	0,53±0,04h	0,34±0,08l	0,08±0,01m	0,95±0,01ef
P. citrinum ATCC 28752	2,86±0,02b	2,94±0,00c	2,37±0,04cd	2,13±0,03b
P. digitatum ATCC 26821	0,54±0,02h	0,48±0,02jl	0,31±0,02jl	0,56±0,02g
A. oryzae ATCC 1003	1,29±0,02e	0,30±0,02l	1,04±0,03h	0,46±0,01gh
Candida sp ATCC 34147	0,48±0,02h	0,33±0,01l	0,44±0,02j	0,43±0,01gh
Hansenula sp.	2,20±0,02c	0,69±0,02j	2,64±0,00b	0,91±0,02ef
S. salmonicolor	0,89±0,01g	1,38±0,01gh	1,62±0,01fg	1,23±0,01d
Isolados e selecionados				
W16(F)	0,38±0,01hi	0,20±0,00m	1,06±0,01h	2,86±0,00a
W28(F)	2,98±0,00b	2,19±0,00e	2,47±0,01c	2,14±0,00b
W29(F)	1,86±0,00cd	2,22±0,02e	1,72±0,01f	0,42±0,01gh
W30(F)	0,41±0,01hi	2,75±0,01cd	1,98±0,01e	1,62±0,02c
W31(F)	2,84±0,01b	1,90±0,01f	1,44±0,00fg	0,66±0,00fg
W23(F)	0,68±0,01g	3,12±0,01bc	3,05±0,01g	3,00±0,00g
W24(F)	3,15±0,00b	3,13±0,00bc	2,85±0,01ab	1,17±0,01de
W25(F)	0,87±0,01fg	0,59±0,01j	0,55±0,01ij	0,77±0,01f
W26(F)	0,75±0,01g	0,84±0,01i	0,37±0,01j	0,39±0,01gh
W27(F)	0,74±0,00g	0,79±0,01i	0,64±0,00i	0,80±0,01f
W22(F)	0,41±0,01hi	0,33±0,01l	0,28±0,01jl	0,12±0,01ij
W11(F)	1,54±0,01de	1,22±0,01h	0,26±0,01l	0,45±0,00gh
W12(F)	2,81±0,00bc	3,85±0,02a	1,97±0,03e	2,00±0,00b
B10(F)	1,84±0,02d	2,28±0,02e	1,32±0,01g	0,88±0,04ef
D2(F)	4,16±0,08a	2,83±0,04c	0,55±0,02ij	0,96±0,01ef
D1(F)	2,77±0,00bc	2,35±0,01de	0,48±0,02j	0,43±0,02gh
E3(F)	2,77±0,03bc	2,26±0,02e	0,64±0,02i	0,63±0,02g

Tabela 44 - Continuação

Micro-organismos	24h	48h	72h	96h
Isolados e selecionados				
J1(F)	2,43±0,01c	1,16±0,02hi	0,58±0,03ij	0,33±0,02h
J6(F)	1,76±0,02d	3,23±0,02b	1,03±0,03h	0,75±0,03f
K8(F)	1,64±0,01d	1,16±0,01hi	0,00±0,01m	0,51±0,04g
L1(F)	1,93±0,04cd	4,21±0,04a	2,51±0,01c	2,34±0,01b
L2(F)	1,53±0,00de	0,53±0,00jl	0,17±0,01l	0,25±0,04hi
L4(F)	2,59±0,01c	3,89±0,02a	1,59±0,01f	2,98±0,00a
L5(F)	0,31±0,06i	0,20±0,03m	0,06±0,03m	0,09±0,00j
L6(F)	2,99±0,00b	1,63±0,00fg	1,73±0,00f	0,64±0,06g
L10(F)	0,42±0,02hi	0,75±0,01j	0,14±0,03lm	0,00±0,03j
L11(F)	2,73±0,04bc	0,63±0,01j	0,20±0,00l	0,16±0,02i
L12(F)	1,54±0,02de	0,53±0,01jl	0,18±0,02l	0,26±0,02hi
M4(F)	2,60±0,03c	1,32±0,01gh	0,56±0,01ij	0,47±0,00gh
M6(F)	0,99±0,08f	0,54±0,02jl	0,21±0,03l	0,98±0,03ef
S2(F)	1,86±0,03cd	1,93±0,01f	0,56±0,05ij	0,55±0,04g
T2(F)	2,75±0,03bc	3,55±0,04ab	2,37±0,02cd	0,25±0,05hi
W1(F)	0,69±0,03g	0,47±0,03jl	0,24±0,04l	0,00±0,01j
W13(F)	1,42±0,02e	0,86±0,02i	1,08±0,00h	0,68±0,01fg
B9(F)	0,38±0,00hi	3,16±0,01b	2,37±0,00cd	0,13±0,00ij
H9(F)	0,09±0,01j	3,03±0,01c	2,49±0,02c	0,00±0,00j
W17(F)	0,11±0,01j	1,15±0,00hi	0,84±0,00hi	0,19±0,01i
R3(F)	2,49±0,01c	2,58±0,00d	2,27±0,02d	1,17±0,00de
W18(F)	0,00±0,00ll	3,04±0,01c	3,11±0,00a	1,13±0,00de
O6(F)	2,70±0,00bc	1,79±0,02fg	1,35±0,02g	1,23±0,04d
W32(F)	1,35±0,01e	0,55±0,01jl	1,28±0,00a	0,81±0,00f
W34(F)	1,84±0,02cd	0,62±0,01j	0,36±0,01jl	1,29±0,01d
W33(F)	0,43±0,00hi	0,36±0,01l	0,34±0,00jl	1,15±0,01de
W35(F)	1,64±0,00d	3,09±0,01c	2,72±0,01b	1,73±0,01c
W37(F)	0,67±0,03g	0,00±0,00n	0,00±0,00m	0,86±0,01f
W36(F)	0,65±0,00g	0,14±0,00mn	0,00±0,00m	0,67±0,00fg
W42(F)	1,19±0,00ef	2,13±0,00e	1,25±0,00g	1,91±0,01bc
W38(F)	0,60±0,00gh	1,23±0,01h	0,46±0,01j	0,17±0,00hi
W39(F)	0,45±0,00hi	1,55±0,02g	0,82±0,00hi	0,68±0,00fg
W40(F)	0,98±0,00f	1,78±0,01fg	1,04±0,01h	0,00±0,00j
W41(F)	1,53±0,01de	1,65±0,01fg	0,54±0,00ij	1,32±0,01d
W50(F)	1,55±0,01de	1,37±0,01gh	1,21±0,01gh	1,07±0,01e
W49(F)	1,07±0,01f	1,16±0,01hi	0,92±0,01h	0,97±0,01ef
W48(F)	1,71±0,00d	1,12±0,01hi	1,07±0,01h	0,94±0,00ef
W47(F)	1,05±0,01f	0,68±0,00j	0,57±0,01ij	0,66±0,09fg

Tabela 44 - Continuação

Micro-organismos	24h	48h	72h	96h
Isolados e selecionados				
W46(F)	1,85±0,01d	1,32±0,09gh	1,19±0,01h	1,27±0,00d
W43(F)	3,55±0,00ab	2,76±0,01c	1,97±0,01e	1,93±0,01bc
W44(F)	1,44±0,00e	2,86±0,02c	3,01±0,02a	1,98±0,03bc
W52(F)	1,43±0,01e	2,24±0,01e	3,03±0,01a	1,35±0,01d
W45(F)	1,96±0,02cd	2,40±0,03de	2,22±0,02d	1,03±0,01e
W51(F)	1,19±0,02ef	2,46±0,02d	2,77±0,05b	1,61±0,01cd
W57(F)	2,23±0,01c	1,52±0,01g	1,46±0,01fg	1,32±0,02d
W58(F)	1,78±0,00d	1,60±0,00fg	1,24±0,01g	1,69±0,01c
W53(F)	2,52±0,01c	1,24±0,01hi	1,57±0,0f	1,51±0,01cd
W54(F)	2,74±0,01bc	0,74±0,01j	1,76±0,0f	1,23±0,01d
W55(F)	1,23±0,01ef	0,86±0,01i	1,81±0,0f	1,37±0,01d
W56(F)	2,63±0,01bc	1,62±0,01fg	2,03±0,01e	1,20±0,02de
W1(F)	1,69±0,01d	0,92±0,01i	0,84±0,01hi	2,34±0,02b
W21(F)	0,36±0,01hi	0,14±0,01mn	0,88±0,02hi	0,31±0,01h
W19(F)	0,55±0,00h	0,54±0,00jl	0,92±0,01h	2,11±0,01b
W20(F)	2,73±0,02bc	2,36±0,00de	2,29±0,01d	1,72±0,01e
W15(F)	0,31±0,00i	0,32±0,00l	1,04±0,01h	0,17±0,00i
I3 (B)	1,25±0,00ef	0,86±0,00i	0,74±0,01i	1,93±0,01bc
P2 (B)	2,79±0,01bc	0,93±0,01i	0,85±0,01hi	2,94±0,01a
G6 (B)	3,04±0,01cd	0,00±0,01n	1,08±0,01h	2,46±0,01b
S1 (B)	1,07±0,01f	2,95±0,01c	1,90±0,01e	1,72±0,01c
O2 (B)	0,59±0,01h	0,47±0,01jl	0,46±0,01j	0,74±0,02f
K3 (B)	3,17±0,01b	3,18±0,01b	3,19±0,01a	0,74±0,02f
U2 (B)	1,60±0,01d	1,88±0,01fg	2,22±0,01d	0,71±0,01f
I15 (B)	1,13±0,01f	1,88±0,01fg	2,05±0,01f	1,20±0,02d
B4 (B)	1,53±0,02de	0,89±0,01i	0,28±0,01jl	1,46±0,04cd
G1 (B)	2,84±0,00b	1,38±0,02gh	0,23±0,02jl	1,16±0,04de
M1 (B)	0,44±0,01hi	0,00±0,00n	0,00±0,00m	0,00±0,00j
K6 (B)	2,30±0,01c	2,08±0,01f	2,57±0,01c	1,93±0,01bc
K5 (B)	2,14±0,01cd	1,73±0,00fg	1,77±0,01f	0,57±0,01g
Q2 (B)	2,10±0,00cd	1,21±0,00h	1,45±0,01g	1,23±0,01d
J9 (B)	1,77±0,01d	1,87±0,01f	1,93±0,01e	1,88±0,01b
H5 (B)	1,23±0,02ef	0,70±0,01j	0,25±0,02l	0,74±0,04f
H3(F)	2,76±0,02bc	2,35±0,02de	1,36±0,02g	0,87±0,01ef
H8(F)	2,25±0,02c	4,11±0,03a	1,45±0,03fg	1,36±0,04d
I8(F)	2,93±0,04b	2,93±0,02c	2,25±0,04d	1,35±0,01d
I14(F)	2,75±0,04bc	0,97±0,03i	0,65±0,02i	0,57±0,02g

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais em cada coluna dos tempos de fermantação não diferem estatísticamente à nível de 5 % (Teste de Tukey); ** (F) Fungos Filamentosos, ***(B) Bactérias

APÊNCIDE II

Tabela 45 – Estudo cinético da produção de pectina liase (PMGL) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH.

	Atividade de PMGL (U/mL)							
Ensaios	**24 h**	**pH**	**48 h**	**pH**	**72 h**	**pH**	**96 h**	**pH**
1	8,59	5,15	3,58	5,07	1,87	7,85	8,44	7,89
2	2,04	4,67	2,60	6,95	1,07	6,22	9,95	4,8
3	0	5,65	0	6,85	0	8,09	3,68	8,52
4	5,10	5,38	6,54	5,51	1,75	7,09	11,39	8,18
5	3,83	4,56	6,81	4,7	2,47	4,31	5,14	5,54
6	8,83	5,68	11,15	5,63	0,00	7,34	7,02	8,11
7	5,47	5,37	1,37	7,36	1,94	8,11	0	8,91
8	0	5,5	1,50	6,27	1,20	7,72	0	8,44
9	0,29	5,2	0	4,34	2,26	4,96	0	5,64
10	2,68	4,44	5,48	4,36	5,78	4,43	0	4,59
11	0,84	4,56	0,28	4,53	0,18	7,1	0	8,1
12	0	4,92	0,37	4,2	0	3,81	0	4,35
13	3,29	5,14	3,42	6,26	3,10	8,08	5,51	8,33
14	3,50	5,17	3,51	6,21	3,49	8	6,84	8,12
15	3,70	5,11	2,93	6,54	3,30	8	6,17	8,63

APÊNDICE III

Tabela 46 – Estudo cinético da produção de pectinametilesterase (PME) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH.

Atividade de PME (U/mL)								
Ensaios	**24 h**	**pH**	**48 h**	**pH**	**72 h**	**pH**	**96 h**	**pH**
1	1,00	5,15	1,00	5,07	0,0	7,85	0,0	7,89
2	0,30	4,67	0,10	6,95	0,20	6,22	0,10	4,8
3	1,70	5,65	0,50	6,85	0,0	8,09	0,0	8,52
4	0,90	5,38	0,50	5,51	0,0	7,09	0,0	8,18
5	1,40	4,56	1,50	4,7	1,80	4,31	1,00	5,54
6	2,10	5,68	2,00	5,63	0,0	7,34	0,0	8,11
7	1,00	5,37	0,0	7,36	0,0	8,11	0,0	8,91
8	2,00	5,5	0,80	6,27	0,0	7,72	0,0	8,44
9	1,00	5,2	1,10	4,34	1,00	4,96	1,10	5,64
10	1,20	4,44	1,30	4,36	1,20	4,43	1,00	4,59
11	0,50	4,56	0,50	4,53	0,0	7,1	0,30	8,1
12	0,20	4,92	0,20	4,2	0,20	3,81	0,0	4,35
13	0,75	5,14	0,50	6,26	0,0	8,08	0,0	8,33
14	0,60	5,17	0,70	6,21	0,0	8	0,0	8,12
15	0,90	5,11	0,40	6,54	0,0	8	0,0	8,63

APÊNDICE IV

Tabela 47 – Estudo cinético da produção de pectinesterase (PE) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH.

Atividade de PE (U/mL)								
Ensaios	**24 h**	**pH**	**48 h**	**pH**	**72 h**	**pH**	**96 h**	**pH**
1	0	5,15	0,0257	5,07	0,0043	7,85	0,0003	7,89
2	0	4,67	0,3599	6,95	0,0017	6,22	0,0060	4,8
3	0	5,65	0,0429	6,85	0,0343	8,09	0,0017	8,52
4	0	5,38	0,0086	5,51	0,0043	7,09	0,0171	8,18
5	0	4,56	0,0171	4,7	0,0009	4,31	0,0077	5,54
6	0	5,68	0,0060	5,63	0,0003	7,34	0,0009	8,11
7	0	5,37	0,3000	7,36	0,0026	8,11	0,0017	8,91
8	0	5,5	0,0060	6,27	0,0086	7,72	0,1543	8,44
9	0	5,2	0,0171	4,34	0,1114	4,96	0,0004	5,64
10	0	4,44	0,0043	4,36	0,0171	4,43	0,0086	4,59
11	0	4,56	0,0257	4,53	0,2571	7,1	0,0257	8,1
12	0	4,92	0,0171	4,2	0,0171	3,81	0,0086	4,35
13	0	5,14	0,0086	6,26	0,0086	8,08	0,0026	8,33
14	0	5,17	0,0086	6,21	0,0077	8	0,0023	8,12
15	0	5,11	0,0051	6,54	0,0080	8	0,0025	8,63

APÊNDICE V

Tabela 48 – Estudo cinético da produção de pectato liase (PGL) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burmann por um período de até 96 horas de bioprodução e pH.

	Atividade de PGL (U/mL)							
Ensaios	**24 h**	**pH**	**48 h**	**pH**	**72 h**	**pH**	**96 h**	**pH**
1	0	5,15	0	5,07	0	7,85	0,0009	7,89
2	0	4,67	0	6,95	0	6,22	0	4,8
3	0	5,65	0,0394	6,85	0	8,09	0,0070	8,52
4	0	5,38	0	5,51	0	7,09	0	8,18
5	0	4,56	0,0204	4,7	0	4,31	0,0049	5,54
6	0	5,68	0,0844	5,63	0	7,34	0,0570	8,11
7	0,0399	5,37	0	7,36	0	8,11	0,0260	8,91
8	0	5,5	0	6,27	0	7,72	0	8,44
9	0,0162	5,2	0	4,34	0	4,96	0,0045	5,64
10	0	4,44	0,0123	4,36	0	4,43	0,0052	4,59
11	0	4,56	0,0143	4,53	0	7,1	0	8,1
12	0,0020	4,92	0,0015	4,2	0	3,81	0	4,35
13	0	5,14	0,0160	6,26	0	8,08	0	8,33
14	0	5,17	0	6,21	0	8	0	8,12
15	0	5,11	0,0113	6,54	0	8	0,0278	8,63

APÊNDICE VI

Tabela 49 – Monitoramento do pH em todos os ensaios do planejamento experimental fatorial completo 2^2 da produção de exo-PG em biorreator.

	Monitoramento do pH						
Ensaios	**12 h**	**24 h**	**36 h**	**48 h**	**60 h**	**72 h**	**96 h**
1	4,81	4,86	4,51	4,43	4,58	5,04	5,59
2	4,73	4,69	4,56	4,5	4,56	4,47	4,44
3	4,91	4,92	4,6	4,64	4,89	5,06	6,67
4	4,74	4,5	4,55	5,75	5,76	6,03	5,41
5	4,68	4,55	4,48	4,3	4,47	4,88	7,72
6	5,02	4,82	5,02	5,5	5,43	5,27	6,26
7	4,5	4,7	4,23	4,43	5,83	5,22	5,44
8	4,89	5,05	4,58	4,68	5,63	6,49	6,28
9	4,71	4,57	4,19	4,24	6,74	6	6,06
10	4,79	4,81	4,66	4,8	6,6	7,07	5,58
11	5,12	4,94	4,49	4,56	4,66	5,98	4,95