

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

VALERIA BORSZCZ

PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Aspergillus niger* ATCC 9642
EM CULTIVO ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÃO NA
REMOÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS

ERECHIM, RS, BRASIL
JULHO, 2015

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

PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Aspergillus niger* ATCC 9642
EM CULTIVO ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÃO
NA REMOÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS

VALERIA BORSZCZ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Dr^a. Eunice Valduga

Dr^a. Geciane Toniazco Beckes

ERECHIM, RS, BRASIL

JULHO, 2015

Produção de Pectinases por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo
Estado Sólido e Aplicação na Remoção de Biofilmes Microbianos

Valeria Borszcz

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Data da defesa: 17/06/2015.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Eunice Valduga, Dr^a. Sc
Orientadora

Prof^a. Geciane Toniazco Backes, Dr^a. Sc.
Orientadora

Prof^a. Jamile Zeni, Dr^a. Sc
URI – Erechim

Prof^a. Natália Paroul, Dr^a. Sc
URI – Erechim

Prof. Mauricio Moura da Silveira, Dr. Sc
UCS – Caxias do Sul

Prof^a. Jonaina Pili, Dr^a. Sc
IDEAU – Getúlio Vargas

ERECHIM, RS, BRASIL

JULHO, 2015

DEDICATÓRIA

Este trabalho não é apenas um relato da bioprodução, caracterização e aplicação de enzimas, mas também um inventário do meu cotidiano como pesquisadora; cheio de responsabilidade, incumbência, dúvidas e preocupações; desafiando-me a abrir a mente para novos conhecimentos.

*Dedico essa obra à minha imensa família, em especial à minha mãe Carolina (tão religiosa e otimista, *in memoriam*) e ao meu pai José (tão sereno e querido, *in memoriam*), por terem se dedicado uma vida inteira ao trabalho e aos seus oito filhos, sendo exemplos de coragem para mim.*

“A vida é arte do encontro

Embora haja tanto desencontro pela vida”

(*Samba da benção* - Baden Powell e Vinicius de Moraes)

AGRADECIMENTOS

Durante o período que frequentei a URI foram muitas as pessoas interessantes que conheci e que fizeram parte deste trabalho. Começo os meus agradecimentos, de maneira especial, às professoras orientadoras Eunice e Geciane por ter me aceitado como orientanda, pela disponibilidade, compreensão, competência na orientação e acima de tudo pelo conhecimento técnico e relação dialética.

Envio, com imenso carinho, um agradecimento especial à Ana, Luana, Taisa e Juliana, por fazerem parte da construção desse trabalho, aos colegas de Pós-Graduação Viviane, Cindy, Mariane, Jonaina, Rúbia, Josiane, Márcia e Iloir, aos professores que mediaram conhecimento e aos funcionários da central de atendimento e prestação de serviço.

Outras pessoas não integrantes dessa instituição de ensino também contribuíram para o meu amadurecimento como ser humano e pesquisadora. Agradeço então, aos meus colegas do IFRS - Erechim pela amizade, informações técnicas e principalmente pelo imenso carinho que tiveram comigo.

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 de Pectinases por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo Estado Sólido e Aplicação na Remoção de Biofilmes Microbianos

Valeria Borszcz

Orientadores: Eunice Valduga e Geciane Toniazzi Backes.

O objetivo do presente estudo visa otimizar e/ou maximizar as condições de bioprodução e recuperação das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectina metilesterase (PME) e pectina liase (PMGL) produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 cultivado em casca de laranja (CL), farelo de trigo (FT) e água de maceração de milho (AMM), bem como, realizar a caracterização parcial do extrato bruto enzimático e testá-lo na remoção de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp. isolada de superfície de resfriador de expansão para leite. Inicialmente, fez-se a caracterização físico-química dos resíduos e foram investigados os efeitos da concentração de esporos, umidade, pH e tempo na bioprodução da exo-PG. Em seguida, para recuperação das enzimas exo-PG, PME e PMGL, avaliou-se tipos de solventes e soluções extratoras (água destilada, NaCl, Tween 80, tampão citrato e acetato), frequência de agitação (12-348rpm), tempo (4,8-55,2min), temperatura (13,2-46,8°C) e ciclos de extração (10 ciclos). O processo de extração foi otimizado nas condições próximas a 30 °C e 180 rpm para exo-PG, PME e PMGL, por um tempo de contato de 30 min para exo-PG e 55 min para PME e PMGL, utilizando cloreto de sódio (0,1 mol/L) como solvente na razão cultivo:solvente de 1:10 (m:v). Na sequência, determinou-se os efeitos da composição do meio na bioprodução das enzimas utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR 2³) e a máxima atividade de exo-PG foi de 15,5 U/g_{bu} ao utilizar 59 % de CL, 15 % de FT e 26 % de AMM; de PME foi de 11,0 U/g_{bu}, utilizando 75,9 % de CL, 5,1 % de FT e 20 % de AMM; e, de PMGL foi 78,5 U/g_{bu}, com 88,9 % de CL e 11,1 % de AMM. Nestas concentrações, acompanhou-se a cinética de bioprodução das pectinases, concentração celular, pH e consumo de açúcares redutores totais durante 204 h e a máxima atividade enzimática foi observada após 84 e 132 h de cultivo para exo-PG e PMGL, respectivamente e em 36 h, para PME. Os extratos brutos pectinolíticos apresentaram condições ótimas de pH e temperatura de 5,0/50 °C, 9,8/45 °C e 5,5/55 °C para exo-PG, PME e PMGL, respectivamente. Quanto a caracterização à estabilidade térmica, as enzimas exo-PG e PMGL mantiveram-se estáveis em 40 e 50 °C, durante 1 e 3 h de incubação, respectivamente. A enzima PME apresentou 80 % de sua atividade remanescente durante 24 h de estocagem nas temperaturas de 40 a 70 °C. Nas condições de congelamento (-80 e -10 °C) e refrigeração (4 °C), as enzimas PME e exo-PG mantiveram 70% de sua atividade após 21 semanas, porém o mesmo comportamento não foi observado para a enzima PMGL, que reduziu 50 % da sua atividade em 4 semanas de armazenamento a baixas temperaturas. Quanto a estabilidade ao pH, observou-se que as enzimas exo-PG e PMGL são estáveis em pH 5. Finalizando este trabalho, concentrações de extrato bruto enzimático (1:2,5, 1:5, 1:7,5, m:v) recuperados do cultivo estado sólido, empregando NaCl (0,1 mol/L) como solvente de extração, foram testados na remoção de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp. em diversos tempos de incubação (10 a

360 min). Constatou-se um percentual de remoção do biofilme de aproximadamente 75% nos tempos de 60 e 360 min ao utilizar o complexo enzimático das diferentes concentrações. Em tempos de incubação mais curtos (10 min), ao aplicar extrato mais concentrado (1:2,5, m:v), 77 % do biofilme, previamente formado em microplacas de poliestireno, foi removido. O extrato bruto obtido do cultivo estado sólido a base de 16 g de casca de laranja, 2 g de farelo de trigo e 3,68 g de água de maceração de milho apresentou metabólitos que se mostraram satisfatórios na remoção de biofilmes bacterianos. Há possibilidade de enzimas polissacarídicas estarem agindo sinergeticamente na quebra da matriz polimérica do biofilme formado por *Pseudomonas* sp. isolada de resfriador de expansão de leite cru.

Palavras-Chave: Pectinase, caracterização enzimática, resíduos agroindustriais, biofilme.

Abstract of Thesis presented to Food Engineering Program from Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões as a partial fulfillment of the requirements for obtaining the Degree of Doctor in Food Engineering.

Pectinases Production by *Aspergillus niger* ATCC 9642 in Solid State Cultivation and Application in Removal of Microbial Biofilms

Valeria Borszcz

Advisors: Eunice Valduga and Geciane Toniazzo Backes.

The aim of this study was to optimize and/or maximize the conditions of bioproduction and recovery of exo-polygalacturonase (exo-PG), pectin methyl esterase (PME) and pectin lyase (PL) produced by *Aspergillus niger* ATCC 9642 grown on orange peel (OP), wheat bran (WB) and corn steep liquor (CSL), as well as performing the partial characterization of the enzymatic crude extract and test it in removing biofilms formed by *Pseudomonas* sp. isolated from milk cooling tanks. Initially, the physicochemical characterization of residue was measured the effects of the concentration of spores, moisture, pH and time in the exo-PG bioproduction was investigated. Aiming, to recover the enzymes exo-PG, PME and PL, types of solvent and solutions (distilled water, NaCl, Tween-80, acetate and citrate buffer), agitation rate (12-348 rpm), time (4.8-55.2 min), temperature (13.2 to 46.8 °C) and extraction cycles (10 cycles) were evaluated. The extraction process was optimized in conditions about to 30 °C and 180 rpm for exo-PG, PME and PL, for a contact time of 30 min for exo-PG and 55 min for PME and PL, used sodium chloride (0,1 mol/L) as solvent and ratio cultivation:solvent 1:10 (w:v). Then, the effects of the medium composition in the bioproduction of the enzyme were evaluated using Central Composite Rotational experimental planning (DCCR 2³). Maximum activity of exo-PG was 15.5 U/g_{bu} when using 59% of OP, 15% WB and 26% of CSL; of PME was 11.0 U/g_{bu} using 75.9% OP, 5.1% WB and 20% CSL; and, of PL was 78.5 U/g_{bu}, with 88.9% of OP and 11.1% of CSL. At these concentrations, kinetic evaluation of bioproduction of pectinases in terms of cell concentration, pH and total reducing sugars consumption, during 204 h of cultivation were observed and maximum enzymatic activity was observed found after 84 and 132 h of cultivation for exo-PG and PL, respectively and 36 h for PME. The pectinolytic crude extracts showed optimum conditions of pH and temperature of 5.0/50 °C, 9.8/5.5 °C and 45/55 °C for exo-PG, PME and PL, respectively. For the thermal stability, enzymes exo-PG and PL remained stable at 40 and 50 °C for 1 to 3 h incubation, respectively. The enzyme PME showed 80 % of its activity remaining for 24 h storage at temperatures of 40 to 70 °C. In freezing conditions (-80 and -10 °C) and cooling (4 °C) enzymes exo-PG and PME retained 70% of its activity after 21 weeks, but the same behavior was not observed for the PL enzyme, which reduced 50 % of its activity in 4 weeks storage at low temperatures. Exo-PG and PL enzymes show to be stable at pH 5. Finally, different concentrations of enzymatic crude extract (1:2.5, 1:5, 1:7.5, w:v) recovered of solid state cultivation employing NaCl (0.1 mol/L) as extraction solvent, were tested in removing biofilms formed by *Pseudomonas* sp. during several incubation times (10 to 360 min). Approximately 75 % of biofilm removal in 60 and 360 min when different concentrations of enzyme complex were used. In shorter incubation times (10 min) when more concentrated extract (1:2.5, w:v) was applied, 77 % of the biofilm, previously formed

polystyrene microplate, was removed. The crude extracts obtained from cultivation in the solid base of 16 g of orange peel, 2 g of wheat bran and 3.68 g of corn steep liquor have resulted in metabolites that satisfactorily removed bacterial biofilm. Polysaccharides enzymes could be acting synergistically in the breakdown of the polymer matrix of the biofilm formed by *Pseudomonas* sp. isolated of milk cooling tanks.

Key-words: Pectinases, enzyme characterization, agro-industrial residues, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos principais componentes estruturais da parede celular primária..	4
Figura 2: Estrutura molecular da pectina..	5
Figura 3: Fluxograma das etapas de produção em cultivo estado sólido por <i>A. niger</i> ATCC 9642 e extração enzimática.	26
Figura 4: Atividade de exo-PG em função do tempo de fermentação (24 a 96 h) empregando diferentes concentrações de esporos (5×10^4 a 5×10^7 esporos/g _{bu})	44
Figura 5: Atividade da exo-PG em diferentes teores de umidade (30 a 70 %) e tempos de fermentação (0 a 96 h), utilizando casca de laranja triturada <i>in natura</i> e pré-dessecada	45
Figura 6: Atividade da exo-PG em diferentes tempos de fermentação (24 a 240 h)	46
Figura 7: Produção de exo-PG em diferentes valores de pH (2,5 a 6,5)	47
Figura 8: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para a recuperação da exo-PG (U/g _{bu}) em função da agitação e temperatura	51
Figura 9: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para a recuperação da PME (U/g _{bu}) em função do tempo e temperatura	52
Figura 10: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da PMGL (U/g _{bu}) em função da agitação e temperatura	54
Figura 11: Evolução da atividade enzimática de exo-PG (a), PME (b) e PMGL (c) após sucessivas extrações do meio fermentado, sem homogeneização (estático, tratamento 1) e homogeneizado a cada ciclo (tratamento 2)	57
Figura 12: Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2^3 no valor da atividade enzimática (exo-PG)	59
Figura 13: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da exo-PG (U/g _{bu}) em função da concentração de farelo de trigo (g) e água de maceração de milho (g)	61
Figura 14: Superfícies de resposta (esquerda) e curvas de contorno (direita) na atividade da PME (U/g _{bu}) em função da quantidade em gramas de casca de laranja e farelo de trigo (a), casca de laranja e água de maceração de milho (b) e, farelo de trigo e água de maceração de milho (c)	63
Figura 15: Superfícies de resposta (esquerda) e curvas de contorno (direita) na atividade da PMGL (U/g _{bu}) em função da concentração de casca de laranja e farelo de trigo (a), casca de laranja e água de maceração de milho (b) e, farelo de trigo e água de maceração de milho (c)	65

Figura 16: Estudo cinético da bioprodução de exo-PG e pH (a), atividade enzimática da PME e PMGL (b) e crescimento celular e açúcares redutores totais (c), em função do tempo	68
Figura 17: Estudo cinético da bioprodução de PME e pH (a), atividade enzimática da exo-PG e PMGL (b) e biomassa e açúcares redutores totais (c), em função do tempo	71
Figura 18: Estudo cinético da bioprodução de PMGL e pH (a), atividade enzimática da exo-PG e PME (b) e, biomassa e açúcares redutores totais (c), em função do tempo	73
Figura 19: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da exo-PG (U/g _{bu}) em função do pH e da temperatura	78
Figura 20: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da PMGL (U/g _{bu}) em função do pH e da temperatura	80
Figura 21: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da PME (U/g _{bu}) em função do pH e da temperatura	82
Figura 22: Efeito de altas (a) e baixas (b) temperaturas e do pH (c) na estabilidade do extrato bruto enzimático da exo-PG em função do tempo de incubação.	84
Figura 23: Efeito de altas (a) e baixas (b) temperaturas na estabilidade do extrato enzimático da PME em função do tempo de incubação	86
Figura 24: Efeito de altas (a) e baixas (b) temperaturas e do pH (c) na estabilidade do extrato enzimático da PMGL em função do tempo de incubação	87
Figura 25: Percentual de remoção de biofilme bacteriano (<i>Pseudomonas</i> sp.) após tratamento com extrato enzimático em função do tempo de contato (30 a 360 min) e razão soluto:solvente de extração (1:2,5 a 1:7,5 m:v)	88
Figura 26: Percentual de remoção de biofilme bacteriano (<i>Pseudomonas</i> sp.) após tratamento com extrato enzimático, na concentração de extração de 1:2,5 (m:v), em função do tempo de contato (10 a 120 min)	89
Figura 27: Correlação entre o teor de glicosamina (mg) e biomassa seca (mg) de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 cultivado em meio líquido.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das substâncias pécticas.....	5
Tabela 2: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da exo-PG, PME e PMGL.	25
Tabela 3: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para a bioprodução de exo-PG, PME e PMGL.	27
Tabela 4: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para a bioprodução de exo-PG.	28
Tabela 5: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de pH e temperatura ótima das enzimas exo-PG e PMGL.	29
Tabela 6: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de pH e temperatura ótima da enzima PME.	29
Tabela 7: Características físico-químicas dos resíduos agroindustriais e no meio formulado.	41
Tabela 8: Teores de componentes minerais nos resíduos agroindustriais e no meio formulado.	41
Tabela 9: Atividade enzimática das pectinases utilizando diferentes tipos de solventes e soluções no processo de extração da enzima hidrossolúvel.	48
Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) da recuperação enzimática e as respostas em atividade de exo-PG, PME e PMGL (U/g _{bu}).	50
Tabela 11: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores codificados e reais) e as respostas em atividade de exo-PG, PME e PMGL, obtidos no processo de produção enzimática utilizando diferentes concentrações de substratos.....	58
Tabela 12: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em atividade da exo-PG em função da concentração de farelo de trigo e água de maceração.	60
Tabela 13: Resultados gerais das condições otimizadas e/ou maximizada do processo de bioprodução das enzimas exo-PG, PME e PMGL pelo agente biológico <i>A. niger</i> ATCC 9642 em cultivo estado sólido.....	75
Tabela 14: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) em função da temperatura e pH e as respostas em atividade de exo-PG e PMGL (U/g _{bu}).....	77
Tabela 15: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) em função da temperatura e pH e as respostas em atividade de PME (U/g _{bu}).....	77
Tabela 16: Valores das atividades das enzimas pectinases, celulasas e hemicelulasas no extrato bruto enzimático, obtido da diluição 1:2,5 (m:v) e utilizado na remoção de biofilme de <i>Pseudomonas</i> sp.	91

Tabela 17: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ³ para a extração da exo-PG.....	117
Tabela 18: Análise de variância para a extração da exo-PG do planejamento fatorial completo 2 ³	117
Tabela 19: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ³ para a extração da PME.	118
Tabela 20: Análise de variância para a extração da PME do planejamento fatorial completo 2 ³	118
Tabela 21: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ³ para a extração da PMGL.....	119
Tabela 22: Análise de variância para a extração da PMGL do planejamento fatorial completo 2 ³	119
Tabela 23: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ² para atividade de exo-PG.	120
Tabela 24: Análise de variância para a bioprodução de exo-PG do planejamento fatorial completo 2 ²	120
Tabela 25: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ³ para atividade de pectina metilesterase (PME).	120
Tabela 26: Análise de variância para a bioprodução de PME do planejamento fatorial completo 2 ³	121
Tabela 27: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ³ para atividade de pectina liase (PMGL).....	121
Tabela 28: Análise de variância para a bioprodução de PMGL do planejamento fatorial completo 2 ³	121
Tabela 29: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ² para atividade de poligalacturonase (exo-PG) em função de temperatura e pH.....	122
Tabela 30: Análise de variância para caracterização da exo-PG do planejamento fatorial completo 2 ³	122
Tabela 31: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ² para atividade de pectina metilesterase (PME) em função do pH e temperatura.....	122
Tabela 32: Análise de variância para a caracterização da PME do planejamento fatorial completo 2 ²	123
Tabela 33: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de <i>t</i> e <i>p</i> do planejamento fatorial completo 2 ² para atividade de pectina liase (PMGL).....	123
Tabela 34: Análise de variância para a bioprodução da PMGL do planejamento fatorial completo 2 ³	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação das enzimas pécticas.	7
Quadro 2: Produção de enzimas pectinolíticas em diferentes resíduos sólidos.	15

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	<i>Comprimento de onda</i>
A.	<i>Aspergillus</i>
A_w	<i>Atividade de água</i>
ABS	<i>Absorbância</i>
AMM	<i>Água de Maceração de Milho</i>
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Pectina de Alto Teor de Metoxilação</i>
Ativ	<i>Atividade</i>
BTM	<i>Pectina de Baixo Teor de Metoxilação</i>
CES	<i>Cultivo estado sólido</i>
CL	<i>Casca de laranja</i>
CS	<i>Cultivo Submerso</i>
D	<i>Dextrogiro</i>
d	<i>Diluição</i>
DE	<i>Grau de Esterificação</i>
DNS	<i>Ácido 3,5-dinitrosalisílico</i>
DO	<i>Densidade Ótica</i>
f	<i>Fator de Conversão</i>
FT	<i>Farelo de Trigo</i>
GalA	<i>Ácido Galacturônico</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
M	<i>Molaridade</i>
m/m	<i>Massa por massa</i>
m/v	<i>Massa por volume</i>
N	<i>Normalidade</i>
P.	<i>Penicillium</i>
PG	<i>Poligalacturonase</i>
PGL	<i>Pectato liase</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
PM	<i>Peso Molecular</i>
PME	<i>Pectina metilesterase</i>
PMG	<i>Polimetilgalacturonase</i>
PMGL	<i>Pectina liase</i>
R	<i>Razão</i>
rpm	<i>Rotação por minutos</i>
RS	<i>Rio Grande do Sul</i>
T.	<i>Trichoderma</i>
U*	<i>Unidade de atividade enzimática</i>
U/g	<i>Unidade de atividade/grama</i>
U/g _{bs}	<i>Unidade de atividade/grama sólido fermentado seco</i>
U/g _{bu}	<i>Unidade de atividade/grama sólido fermentado úmido</i>
v/v	<i>Volume por volume</i>
URI	<i>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões</i>
UV	<i>Ultra Violeta</i>

* A atividade enzimática é expressa em Unidade Internacional (UI), que é definida como a quantidade que irá catalisar a transformação de 1 μ mol de substrato por minuto sob condições ótimas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	PECTINA	4
2.2	ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E SUAS APLICAÇÕES	6
2.3	CULTIVO ESTADO SÓLIDO.....	11
2.4	BIOFILME BACTERIANO	19
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS	22
3.2	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE BIOPRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PECTINASES	22
3.2.1	Micro-organismo	22
3.2.2	Cultivo estado sólido.....	23
3.2.3	Avaliação de fatores que influenciam a bioprodução	23
3.2.4	Avaliação dos fatores que influenciam no processo de extração	25
3.3	MAXIMIZAÇÃO E/OU OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE PECTINASES	27
3.4	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PECTINASES.....	28
3.4.1	Avaliação da temperatura e pH ótimos	28
3.4.2	Avaliação da temperatura e do pH de estabilidade enzimática	29
3.5	APLICAÇÃO DAS PECTINASES NA REMOÇÃO DE BIOFILMES	30
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	31
3.6.1	Açúcares redutores totais (ART)	31
3.6.2	Atividade de água.....	32
3.6.3	Atividade da exo-PG.....	32
3.6.4	Atividade da PME	33
3.6.5	Atividade da PMGL	34
3.6.6	Atividade da FPase.....	34
3.6.7	Atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)	35
3.6.8	Atividade da Xilanase.....	35
3.6.9	Determinação da concentração celular (Biomassa).....	35
3.6.10	Determinação de minerais totais componentes minerais	36
3.6.11	Quantificação de pectina.....	37

3.6.12	pH.....	37
3.6.13	Umidade.....	38
3.6.14	Determinação dos fatores de produção, conversão e da produtividade do processo.....	38
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS	40
4.2	ESTUDO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA BIOPRODUÇÃO DA EXO-PG.....	43
4.2.1	Concentração inicial de esporos.....	43
4.2.2	Teor inicial de umidade dos meios.....	44
4.2.3	Tempo de fermentação.....	46
4.2.4	Efeito do pH.....	47
4.3	EFEITOS DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA RECUPERAÇÃO DE PECTINASES.....	48
4.3.1	Solvente de extração	48
4.3.2	Otimização do processo de recuperação de pectinases	49
4.3.3	Avaliação do ciclo de extração	56
4.4	MAXIMIZAÇÃO E/OU OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE PECTINASES	58
4.4.1	Exo-Poligalaturonase - PG.....	58
4.4.2	Pectina metilesterase - PME	62
4.4.3	Pectina liase - PMGL.....	64
4.5	CINÉTICA DA BIOPRODUÇÃO DAS PECTINASES EM CES	67
4.5.1	Cinética de bioprodução da exo-PG	67
4.5.2	Cinética de bioprodução da PME.....	70
4.5.3	Cinética de bioprodução da PMGL	72
4.6	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PECTINASES EM CES.....	76
4.6.1	Avaliação da temperatura e pH ótimos dos extratos brutos enzimáticos.....	76
4.6.2	Avaliação da temperatura e pH de estabilidade enzimática	83
4.7	APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO NA REMOÇÃO DE BIOFILME	88
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	92
6	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICES	117

1 INTRODUÇÃO

Processos biotecnológicos, como o cultivo estado sólido (CES), têm a característica de utilização de substratos de baixos níveis de umidade e micro-organismos adaptáveis a esse meio. Pectinases são enzimas extracelulares que podem ser produzidas por esta tecnologia desempenhando um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, sendo posteriormente recuperadas, purificadas e imobilizadas, com o propósito de aplicá-las em processos da indústria de alimentos, biocombustíveis, papel e celulose, têxtil e clínica.

Substâncias pécicas são fontes de ativação ou indução para a produção de enzimas pectinolíticas, também chamadas de pectinases ou enzimas pécicas. Dentre as enzimas pectinolíticas de uso industrial destacam-se PME (pectina metilesterase), endo e exo-PG (poligalacturonase) e PMGL (pectina liase) utilizadas no processamento de frutas e vegetais e produção de bebidas, como agente clarificante e redutor de viscosidade.

Para a produção de pectinases, muitas condições têm sido estudadas com a necessidade crescente de otimização de produtos e processos, minimização de custos e tempo e maximização de rendimento, produtividade e qualidade dos produtos. Resíduos agroindustriais, com alto teor de pectina são pesquisados visando à produção de enzimas pectinolíticas em CES, como, casca e/ou bagaço de limão (RUIZ *et al.*, 2012), citrus (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011), uva (BOTELLA *et al.*, 2007; DÍAZ *et al.*, 2012) e de maracujá (SOUZA *et al.*, 2010), provenientes principalmente do processamento de sucos. Estes resíduos podem ser utilizados como fonte de carbono, energia e suporte inerte para o crescimento e manutenção de fungos filamentosos.

O Brasil destaca-se na produção de frutas tropicais e grãos. A diversidade da indústria e a disponibilidade de recursos naturais concedem ao país excelentes oportunidades para se desenvolver de forma sustentável, combinando crescimento econômico, inclusão social e conservação ambiental (ABIA, 2012). Em 2014, o país produziu aproximadamente 14 milhões de toneladas de laranja e o estado do Rio Grande do Sul (RS) apresenta grande relevância na citricultura brasileira, sendo o sexto maior produtor nacional desta cultura (IBGE, 2015). A região do Alto Uruguai, considerada uma das principais regiões produtoras de citros do RS, abrange 50 municípios, onde a citricultura é fomentada pela agricultura familiar na pequena propriedade rural gerando renda e emprego. O município de Erechim/RS, com tradição agrícola na exploração de

culturas de grãos, vem despertando o interesse pela produção de frutas regionais, tais como, pêssego, uva, maçã, caqui, ameixa, figo e citros (ROSA, 2010). Quanto à produção de trigo, a região Sul responde por 95 % da produção deste cereal e o RS é o segundo maior produtor nacional desta cultura (IBGE, 2015).

O setor da alimentação conta com o fato de gerar subprodutos que são destinados, principalmente, para a ração animal. Para aumentar a eco-sustentabilidade das indústrias é necessário explorar os subprodutos por elas gerados antes de se tornarem resíduos. Portanto, há necessidade de investigar novas tecnologias de produção e recuperação de biomoléculas, que poderão ser utilizadas para produzir alimentos funcionais ou como coadjuvantes em processamento de alimentos e bebidas, bem como, no processo de biocombustíveis ou em preparações medicinais e farmacêuticos. Contudo, o incentivo à produção de biocompostos de alto valor agregado vem aumentando com o passar das décadas e novas alternativas de aplicações dos metabólicos gerados estão sendo investigados, por exemplo, a utilização de enzimas na remoção de biofilmes bacterianos.

Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de células microbianas envoltas por uma matriz polimérica e aderidas a uma superfície. Na indústria de alimentos, principalmente de origem animal, a formação de biofilmes pode causar perda da produção e transmissão de doenças, devido à contaminação dos alimentos por micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

A adesão microbiana e a formação de biofilmes ocorrem com maior frequência em equipamentos que apresentam certa complexidade no processo de higienização, como trocadores tubulares e a placa, dutos, gaxetas e válvulas. É importante impedir o início da formação de biofilme recorrendo ao uso correto de agentes de limpeza e sanitização, materiais de superfícies inertes, matéria-prima com baixa carga microbiana e atuação efetiva dos manipuladores. Porém, quando não se cumpre as normas de boas práticas de fabricação, a formação de biofilme é inevitável.

No biofilme formado, os micro-organismos são resistentes à ação de agentes químicos (alcalinos e ácidos) e físicos (baixa transferência de calor), portanto, a utilização de enzimas polissacarídicas torna-se uma alternativa como agente anti-incrustante. Com a abertura da matriz polimérica ocorre a exposição das células aos agentes sanitizantes contribuindo para o sucesso do processo de higienização de toda linha de processamento de alimentos e bebidas.

Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi destinar resíduos agroindustriais para a produção de biocompostos de interesse comercial e avaliar potenciais aplicações do extrato bruto obtido. Para tanto, uma mistura composta de casca de laranja triturada, farelo de trigo e água de maceração de milho foi utilizada como substrato no processo de CES pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 visando à maximização e/ou otimização da produção, caracterização e aplicação de pectinases na remoção de biofilmes bacterianos.

Para essa pesquisa alguns objetivos específicos foram traçados:

- ✓ Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais;
- ✓ definição da concentração de esporos, umidade, pH do meio e tempo de bioprodução, para a máxima produção da exo-PG;
- ✓ otimização/maximização do processo de recuperação das enzimas exo-PG, PME e PMGL avaliando tipos de solventes e soluções extratoras, tempo, temperatura, frequência de agitação e sucessivos ciclos de extração;
- ✓ avaliação de diferentes composições do meio de cultivo (estado sólido), visando à otimização da bioprodução das pectinases;
- ✓ realização do estudo cinético do processo nas condições otimizada/maximizada;
- ✓ caracterização parcial das enzimas exo-PG, PME e PMGL em termos de pH e temperatura ótima e de estabilidade, e;
- ✓ aplicação do extrato bruto enzimático na remoção de biofilme formado por *Pseudomonas* sp isolada de resfriador de expansão de leite cru.

Esta tese de doutorado está dividida em capítulos, iniciando pela introdução. O Capítulo 2 apresenta uma breve revisão de literatura pertinente aos temas relacionados à pectina, enzimas pectinolíticas, cultivo estado sólido e biofilme bacteriano. No Capítulo 3, será apresentada a metodologia utilizada para a bioprodução, extração, caracterização, aplicação e quantificação das enzimas pectinolíticas exo-PG, PME e PMGL, bem como para análises de parâmetros de processos.

No Capítulo 4, será apresentado e discutido os resultados do estudo sobre os fatores que interferem na bioprodução (concentração de esporos, umidade, concentração de substrato, pH e tempo de fermentação) e na extração enzimática (tempo de contato, frequência de agitação, temperatura, tipo de solvente e razão solvente/substrato), caracterização parcial e aplicação. Finalizando este trabalho, serão apresentadas as conclusões e perspectivas futuras, a lista de referências e os apêndices.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta o estudo da arte, abordando os seguintes assuntos: pectina (substrato para o micro-organismo e a produção enzimática), enzimas pectinolíticas (interesse comercial), cultivo estado sólido (condições intrínsecas e extrínsecas que definem a taxa de bioprodução enzimática).

2.1 PECTINA

A pectina é formada por uma estrutura complexa de ácidos oligossacarídeos e polissacarídeos de cadeias lineares (homogalacturonana, constituída por ligações 1,4 α -D-ácido galacturônico) e ramificadas (ramnogalacturonana I e II), composta por resíduos de L-ramnose, arabinose, galactose, xylose, entre outros (KASHYAP *et al.*, 2001; WILLATS *et al.*, 2006; PEDROLI *et al.*, 2009; LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011; CANTERI *et al.*, 2012; LADEIRA, 2013). Encontra-se principalmente na lamela média dos tecidos de plantas superiores atuando como suporte e agente coesivo para outros polissacarídeos (celulose e lignina) e proteínas presentes na parede celular primária (Figura 1).

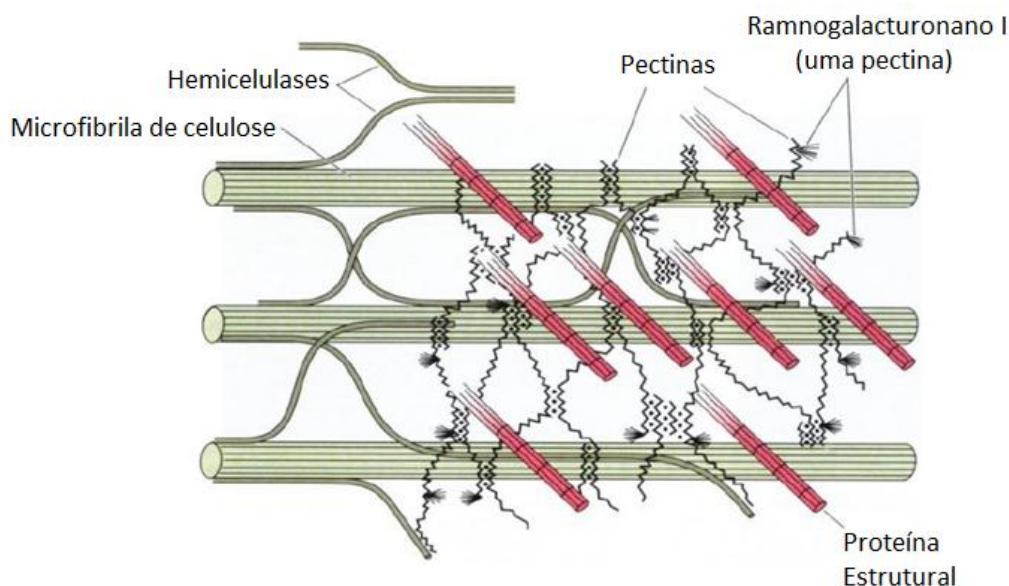


Figura 1: Representação dos principais componentes estruturais da parede celular primária. Fonte: BRETT e EALDRON (1996) *apud* LADEIRA (2013).

A pectina, em conjunto com a protopectina, ácido péctico e ácido pectínico formam o grupo das substâncias pécticas, mostrados na Tabela 1 (CARPITA e McCANN, 2000; RIDLEY *et al.*, 2001; WILLATS *et al.*, 2001).

Tabela 1: Características das substâncias pécticas.

Substâncias pécticas	Características
Ácido Péctico	Composta por ácido galacturônico coloidal, completamente isentas de grupos metoxilas.
Ácido Pectínico	Cadeia polimérica solúvel em água que contém menos de 65 % de unidades de galacturonato metiladas.
Pectina	Material polimérico solúvel em água no qual, pelo menos, 65 % dos grupos carboxila das unidades de galacturonato são metil esterificados.
Protopectina	Substância péctica insolúvel em água e que está presente em tecidos vegetais intactos. Pode ser hidrolisada a pectina, ácido péctico ou pectínico.

Fonte: CARPITA e McCANN (2000), RIDLEY *et al.* (2001), WILLATS *et al.* (2001).

Alguns grupos carboxilas da molécula do ácido galacturônico das substâncias pécticas são esterificados com grupos metil (Figura 2). Dependendo do grau de esterificação (*Degree of esterification* - DE), comercialmente, as substâncias pécticas são divididas em dois grupos: pectina de alta metoxilação - ATM (DE maior de 50 %) e pectina de baixa metoxilação - BTM (DE menor que 50 %) (KASHYAP *et al.*, 2001; IGLESIAS e LOZANO, 2004; CANTERI *et al.*, 2012).

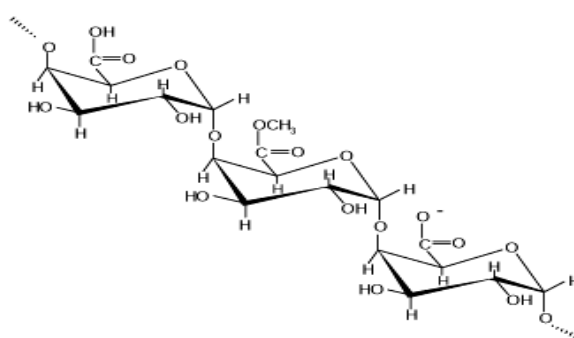


Figura 2: Estrutura molecular da pectina. Fonte: CANTERI *et al.* (2012).

Pectina extraída de citros, maçã (77 e 71 % DE, respectivamente, pectinas de ATM) e de girassol (19,3 % DE, pectina de BTM) são exemplos desses grupos. Tanto a pectina de girassol, como a de citros e maçã apresentam praticamente a mesma proporção de GalA (85 %) (PANCHEV *et al.*, 2010). Pectina desmetoxilada (ácido péctico, pectínico e

pectato) por ação da enzima pectina metilesterase (PME) pode melhorar a textura de frutas e vegetais, resultando nos grupos carboxil livre, que ao ligar-se com íons bivalentes como o Ca^{2+} forma uma estrutura rígida, tecnologia muito utilizada em produtos de baixo teor calórico (IGLESIAS e LOZANO, 2004).

A pectina comercial é um aditivo alimentar muito empregado no processo de fabricação de geléia, sucos, produtos lácteos, molhos e xaropes, devido suas propriedades geleificante, emulsificante, espessante e estabilizante (THAKUR *et al.*, 1997; LEROUX *et al.*, 2003; EL-SHEEKH *et al.*, 2009; BRASIL, 2010; ZHANG *et al.*, 2011) e na indústria farmacêutica, como ingrediente de medicamentos para tratamento de distúrbios gastrointestinal, diabete e pressão alta (THAKUR, 1997; PAULSEN e BARSETT, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2008). A pectina está sendo, também, utilizada no campo da biomedicina, incluindo a entrega da droga (*Drug Delivery*) e de genes (*Gene Delivery*) diretamente na célula ou local específico, na cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos (MUNARIN *et al.*, 2012).

Porém, além de suas propriedades funcionais, é importante ressaltar que durante a extração de sucos de frutas, a pectina e demais polissacarídeos, juntamente com as substâncias fenólicas e proteicas, são dispersas na solução causando o aumento da viscosidade e turbidez (BAILEY e PESSA, 1990). A ação coloidal da pectina dificulta o processo de fabricação dos sucos, pois os precipitados dificilmente podem ser separados por filtração ou centrifugação devido à grande quantidade de partículas em suspensão (SCHOLS *et al.*, 1991).

2.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E SUAS APLICAÇÕES

Enzimas são proteínas que aceleram as reações químicas. Este processo é chamado de catálise. Nas reações enzimáticas, as enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes das células, denominados de substratos. As enzimas convertem substratos em diferentes moléculas, chamadas de produtos. Portanto, atuam sobre um substrato, exigindo condições adequadas para sua ativação e extração, tais como, tempo, temperatura, pH e quantidade e qualidade de substrato (OORT, 2010; JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013).

As enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas e que são responsáveis pelas características de firmeza e estrutura das plantas superiores são

chamadas de enzimas pécticas, pectinolíticas ou pectinases (BLANCO *et al.*, 1999; PRADE *et al.*, 1999; KAUR *et al.*, 2004; JAYANI *et al.*, 2005; BRIJWANI e VADLANI, 2011).

Para a degradação da biomassa rica em pectina, muitas vezes é necessária a ação conjunta de diversas enzimas, entre elas as celulasas, hemicelulasas e as pectinases, ou ação altamente sinérgica de várias enzimas pectinolíticas (ZHANG *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012; OBEROI *et al.*, 2012). As celulasas e hemicelulasas têm um papel fundamental na quebra das ligações cruzadas das estruturas polissacarídicas da parede celular e na degradação da celulose e hemicelulose, o que expõem mais facilmente a pectina para a atuação das pectinases (BIZ, 2012; STOCK, 2013).

As pectinases, por apresentarem ação catalítica específica, atuam pela preferência no grau de esterificação metílica do substrato (pectina ou ácido péctico), pelo tipo de ruptura aos enlaces glicosídicos (hidrolítica ou trans-eliminativo) e pelo mecanismo de quebra das ligações glicosídicas, se ocorre ao acaso (endo) ou a partir das extremidades não redutoras da cadeia (exo) (KASHYAP *et al.*, 2001; HEERD *et al.*, 2012).

O Quadro 1 apresenta os três grupos de enzimas pectinolíticas, separadas por forma de atuação. Esterase apresenta capacidade de desesterificar a pectina para remoção dos resíduos metoxil, formando ácido péctico ou ácidos pectínicos; despolimerase, caracteriza-se pela quebra da cadeia principal (ligações α -1,4 das cadeias glicosídicas) tanto por hidrólise (hidrolases) quanto por trans-eliminação (liases) e protopectinases hidrolisam a protopectina insolúvel, originando pectina solúvel (ALKORTA *et al.*, 1998; BLANCO *et al.*, 1999; KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI *et al.*, 2005).

Quadro 1: Classificação das enzimas pécticas.

Enzima		Número EC*	Reação catalítica
Esterase	PME (Pectina metilesterase)	3.1.1.11	Pectina + nH ₂ O → pectato + n metanol
	PAE (Pectina acetilesterase)	3.1.1.6	Pectina + nH ₂ O → pectato + n acetato
Despolimerase	Exo-PG (Exo-Poligalacturonase)	3.2.1.67	Ácido péctico + H ₂ O → monogalacturonatos
		3.2.1.82	Ácido péctico + H ₂ O → digalacturonatos
	Endo-PG (Endo-Poligalacturonase)	3.2.1.15	Ácido péctico + H ₂ O → oligogalacturonatos
	PMG (Polimetilgalacturonase)		Pectina → metil oligogalacturonatos
	Exo- PGL (Exo - Pectato liase)	4.2.2.9	Ácido péctico → digalacturonatos insaturados
	Endo- PGL (Endo - Pectato liase)	4.2.2.2	Ácido péctico → oligogalacturonatos insat.
Protopectinase	PPase	4.2.2.10	Pectina → metil oligogalacturonatos insat.
			Protopectina + H ₂ O → pectina solúvel

Fonte: BLANCO *et al.* (1999), YADAV *et al.* (2009a), ALIMARDANI-THEUIL *et al.* (2011).

*Número EC - Enzyme Commission (NC-IUBMB)

Essas enzimas podem ser isoladas de plantas ou produzidas por micro-organismos, insetos e nematóides em culturas de superfície em substratos sólidos (casca de arroz, cascas de frutas, farelo de soja ou farelo de trigo) ou em culturas submersas utilizando substratos líquidos, tais como: melados, goma hidrolisada ou licor de milho (FELLOWS, 2006). Esses substratos podem ser utilizados como suporte inerte e fonte nutricional durante o cultivo. O rendimento da produção depende de diversos fatores, como: tipo da cepa, condição de cultivo (pH, aeração, temperatura e tempo de incubação) e composição do meio de crescimento, particularmente fontes de carbono (HÖLKER *et al.*, 2004; GUMMADI e KUMAR, 2005; JAYANI *et al.*, 2005; MURAD e AZZAZ, 2011).

A aplicação comercial das pectinases foi observada em 1930, porém somente nos anos de 1960 sua estrutura química foi conhecida (DEL CAÑIZO *et al.*, 1994; UHLIG, 1998). Comercialmente a pectinase é um termo geral que se refere a uma mistura de três diferentes atividades enzimáticas: poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectina metilesterase (PME) (DIETRICH *et al.*, 1991; KAUR *et al.*, 2004; JAYANI *et al.*, 2005; PEDROLI *et al.*, 2009). São empregadas na forma de soluções concentradas, em pó ou imobilizadas, sob condições brandas de temperatura e pH, com o objetivo de provocar reações (FELLOWS, 2006; LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011).

Pectinases comerciais são amplamente utilizadas na extração de sucos, porque elas degradam as substâncias pécticas, aumentam a quantidade de sólidos solúveis e proporcionam a diminuição da viscosidade do fluido, promovendo a obtenção de sucos límpidos e de boas características sensoriais (KASHYAP *et al.*, 2001; DE VRIES e VISSER, 2001; ADAPA *et al.*, 2014; IRSHAD *et al.*, 2014; SCHULTZ *et al.*, 2014).

As poligalacturonases (PG) são enzimas hidrolíticas que atua basicamente sobre a homogalacturonase das uniões glicosídicas entre os resíduos não esterificados. Essas enzimas podem ser divididas em três grupos (endo-PG, exo-PG tipo I e exo-PG tipo II) de acordo com sua forma de ação sobre o substrato. Endo-PG atacam o substrato em forma aleatória gerando mesclas de oligo, tri e digalacturonatos e AGal. Exo-PG tipo I (galacturono α -(1 $\rightarrow$ 4)-galacturonosidase) libera AGal e exo-PG tipo II (exo-poli- α -galacturonosidase) libera digalacturonato do extremo não redutor. As endo-PG e exo-PG tipo I foram identificadas em vários fungos filamentosos e têm sido extensamente estudadas (LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011).

As enzimas exo-PG são usadas na área de alimentos devido a sua facilidade de maceração, liquefação e extração, aplicada, tanto na produção de alimentos infantis, como

na clarificação de suco e vinho (LANG e DÖRNENBURG, 2000; SILVA *et al.*, 2005a; TARI *et al.*, 2007; DÍAZ *et al.*, 2013). Alguns micro-organismos possuem muitos genes codificados de poligalacturonases. Em *Aspergillus niger*, por exemplo, há uma família completa de genes que produzem várias isoenzimas com consideráveis diferenças em relação à especificidade por substrato, ao padrão de clivagem e quanto ao pH ótimo de atividade (LANG e DÖRNENBURG, 2000).

A pectina liase (PMGL ou PL) é uma enzima que despolimeriza a pectina com alto grau de metoxilação diretamente por β -eliminação, resultando na formação de ácido galacturônico com uma insaturação entre os carbonos 4 e 5 no final não redutor, causando uma rápida queda na viscosidade da solução do substrato. Esta enzima é particularmente interessante por despolimerizar pectinas sem alterar seu grau de esterificação e sem a necessidade de ação prévia de outra enzima do complexo pectinolítico (MINUSSI *et al.*, 1998; GUMMADI e KUMAR, 2005; YADAV *et al.*, 2009a). As PMGLs são preferíveis no processamento de sucos e vinhos, pois evitam a produção de metanol e com isso, os ésteres voláteis responsáveis pelo aroma específico das frutas não são afetados (DELGADO *et al.*, 1992; TARAGANO e PILOSOF, 1999).

A pectina metilesterase ou pectinaesterase (PME) é uma enzima importante na degradação da pectina, pois catalisa a remoção de grupos metil-ésteres, muito abundantes na pectina cítrica, que tem grau de esterificação variando entre 65 e 75 % (KOPECNY e HODRAVÁ, 1995; NIELSEN e CHRISTENSEN, 2002; JOLIE *et al.*, 2010). Sua atuação no carbono C₆ do GalA, presente na homogalacturonana dominante da pectina, resulta em uma molécula de polipectato (ácido péctico) e a formação de metanol e prótons. Essa reação faz com que o substrato fique mais suscetível à ação de poligalacturonase, podendo acarretar diferentes consequências sobre a textura e firmeza dos tecidos vegetais, purês e pastas vegetais. Além disso, pode favorecer a formação de ligações cruzadas entre moléculas de pectina e íons Ca²⁺, causando precipitação de pectato de cálcio insolúvel e a formação de gel e, consequentemente, ocorrerá um aumento na firmeza dos vegetais (ASSIS *et al.*, 2002; NIELSEN e CHRISTENSEN, 2002; JOLIE *et al.*, 2010).

A PME está envolvida nos seguintes mecanismos em vegetais: crescimento, amadurecimento, abscisão e senescência de frutos; controle do pH entre a matriz das paredes celulares e nos espaços intercelulares (apoplasto); e no processo de expansão celular (ASSIS *et al.*, 2000; REN e KERMONDE, 2000). A PME pode afetar positiva ou

negativamente a qualidade estrutural dos alimentos de origem vegetal, alterando sua estabilidade, viscosidade e textura (ANTHON e BARRETT, 2012).

A interação do ácido pectínico, resultante da ação da PME com íons cálcio e a formação de pectato de cálcio insolúvel, causa perda da estabilidade e da turbidez com consequente clarificação do suco (ASSIS *et al.*, 2000, 2001, 2002). A pectina metilesterase apresenta especial interesse para a indústria de alimentos, tanto por causar a clarificação de sucos durante o processamento, quanto por promover a gelificação de sucos concentrados congelados (ASSIS *et al.*, 2002; JOLIE *et al.*, 2010).

Além das enzimas PG, PMGL e PME, há também outras enzimas que estão envolvidas na degradação das ligações presentes na pectina, como por exemplo, α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55), endo-1,5- α -L-arabinase (E.C. 3.2.1.99), β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), endo-1,4- β -galactanase (E.C.3.2.1.89) e feruloil e *p*-coumaroil esterases (YADAV *et al.*, 2009a).

Há vários estudos sobre a aplicação das enzimas pecticas em indústria de bebidas (auxilia no processo de filtração, clarificação e aumento do rendimento), indústria de alimentos (fermentação de café e chá e extração de óleo), indústria têxtil (degomagem de fibras - algodão, rami, juta e linho), ração animal e indústria de papel e celulose (KASHYAP *et al.*, 2001; HOONDAL *et al.*, 2002; ABDULLAH *et al.*, 2007; CSISZÁR *et al.*, 2007; GRAMINHA *et al.*, 2008; KHAIRNAR *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2009b; BRIJWANI e VADLANI, 2011; SANDRI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; MURTHY e NAIDU, 2012; DÍAZ *et al.*, 2013; PEREZ *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Algumas das aplicações mais específicas destas enzimas, nas indústrias de alimentos e bebidas, incluem o melhoramento na extração de sucos de frutas e de óleo de oliva; liberação de aromas, enzimas e pigmentos; produção de purês com alta viscosidade; produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade; clarificação de sucos de frutas, vinhos e cidras; e alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais (UENOJO e PASTORE, 2007; KHAN *et al.*, 2013). Sandri *et al.* (2013), Esawy *et al.* (2013), Oszmianski *et al.* (2011), Pinelo *et al.* (2010), Santin *et al.* (2008), Landbo *et al.* (2007) e Ortega *et al.* (2004) aplicaram enzimas pectinolíticas no processamento de sucos, tanto na etapa de extração, maceração e clarificação, como para produção de metabólitos de interesse comercial. Romeh *et al.* (2009) avaliaram o efeito do uso destas enzimas para reduzir os níveis de pesticidas em tomate. Orgaz *et al.* (2006) aplicaram enzimas,

produzidas por fungos filamentosos, em matriz de biofilmes bacterianos formados em superfícies, com o objetivo de auxiliar na remoção dos compostos orgânicos aderidos.

Em indústria têxtil e de celulose é muito comum o uso de produtos químicos nas etapas de limpeza, degomagem, tingimento e branqueamento de tecido e papel. A mudança pela utilização de enzimas possibilita a redução acentuada no tratamento dos efluentes, minimizando o efeito da poluição ambiental (COELHO *et al.*, 2008).

Além da aplicação das enzimas em diferentes segmentos industriais, os ácidos galacturônicos e seus derivados, formados pela clivagem das ligações de α -1,4-glicosídica da pectina e do pectato, podem ser utilizados em várias aplicações biotecnológicas: em indústria de alimentos como agente acidulante, em indústria química como agente biodegradável ou surfactantes e como aditivo na formulação de concreto e, em indústria farmacêutica para produção de vitamina C (MOLNÁR *et al.*, 2009; RICHARD e HILDITCH, 2009; BURANA-OSOT *et al.*, 2010; MALLER *et al.*, 2011).

O Brasil, apesar de possuir enorme potencial de produção e aplicação ainda importa pectinases, tornando-se, então, necessário avançar nos estudos dessas enzimas, analisando novas fontes de extração economicamente viáveis, propriedades e condições de aplicação. A atuação de micro-organismos geneticamente modificados pode otimizar a produção de enzimas, aumentando consideravelmente o rendimento enzimático em comparação a uma cepa não modificada (SOLÍS *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2011; HEERD *et al.*, 2014a) e o aproveitamento de resíduos agroindustriais com alto teor de pectina, em cultivo estado sólido, podem reduzir os custos relativo a bioprodução e aumentar o rendimento enzimático.

2.3 CULTIVO ESTADO SÓLIDO

A tecnologia de cultivo estado sólido (CES) ou fermentação em estado sólido (FES) aplica-se aos processos que se referem à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de líquido ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PANDEY *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.*, 2001; PANDEY, 2003; DÌAZ *et al.*, 2007; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Essa tecnologia desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos visando à síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial, como por exemplo, a produção de enzimas para aplicação na produção do café e chocolate (DANTAS e AQUINO, 2010; MURTHY e NAIDU, 2012; HO *et al.*, 2014).

O cultivo estado sólido, portanto, pode ser aplicado para produção de enzimas (KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI *et al.*, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2009), aromas (UENOJO, 2003; ROSSI, 2011), ácido cítrico (LU *et al.*, 1997; VANDENBERGHE *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2003) e láctico (SOCCOL *et al.*, 1994), pigmentos (PANDEY *et al.*, 1991; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003), polyhydroxyalkanoates - PHAs (OLIVEIRA *et al.*, 2007; CASTILHO *et al.*, 2009), surfactantes (ZHU *et al.*, 2013), etanol (ROCHA *et al.*, 2013) e substâncias químicas diversas, utilizando diferentes substratos e micro-organismos.

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica deixa evidente que o grande desafio para a humanidade, nas próximas décadas, é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO *et al.*, 2005).

Resíduos agroindustriais frequentemente são secos e peletizados, servindo como complemento à ração animal ou utilizado como combustível para caldeiras. A polpa cítrica e outros resíduos pécticos, além de servir como nutrientes complementares em rações, podem ser hidrolisados por ácidos diluídos ou por hidrólise enzimática, onde são liberados, principalmente, ácido D-galacturônico e outros açúcares de importância industrial, como a arabinose. Porém, a hidrólise química resulta em elevadas quantidades de efluentes ácidos, consumo de energia, quebra inespecífica de polissacarídeos e degradação dos monômeros liberados. A hidrólise enzimática, apesar do seu custo elevado, torna-se uma alternativa atrativa na substituição de produtos químicos, diminuindo, assim, o impacto ambiental (LEIJDEKKERS *et al.*, 2013).

Resíduos, ricos em substâncias pécticas, são produzidos em quantidades significativas pelas agroindústrias e tornam-se potencial fonte de matéria-prima para diversos bioprocessos. Sua hidrólise não requer processos físico-químicos tão severos quanto aqueles utilizados na hidrólise de resíduos ligno-celulósicos (EDWARDS e DORAN-PETERSON, 2012; KUIVANEN *et al.*, 2014).

As enzimas podem ser produzidas por micro-organismos, utilizando técnicas de cultivo submerso (CS) ou CES. Aproximadamente 90 % de todas as enzimas industriais são produzidas em CS, utilizando processo otimizado e micro-organismos geneticamente modificados (HÖLKER *et al.*, 2004).

Os estudos utilizando a tecnologia de CES focam no desenvolvimento e monitoramento de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais (RAIMBAULT, 1998). Os fungos são potenciais candidatos para produzir enzimas mediante processos de CES.

Uma variedade de produtos enzimáticos comerciais, tais como, compostos de fitases, celulasas, pectinases, xilanases, proteases e glicoamilases são produzidos a partir de fungos. *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* são os principais gêneros utilizados industrialmente para a produção de pectinases, pois estes micro-organismos são capazes de crescer satisfatoriamente no substrato sólido e excretar grandes quantidades de enzimas hidrossolúveis, de fácil método de extração e recuperação (BLANDINO *et al.*, 2001; PANDEY, 2003; SOUZA *et al.*, 2003; BRASIL, 2006; FERREIRA *et al.*, 2013). Além dos fungos filamentosos, leveduras e bactérias (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Bacillus*) também são utilizadas para a produção de enzimas pectinolíticas (GÀMEZ e DÍAZ, 2008; ALIMARDANI-THEUIL *et al.*, 2011; MARTOS *et al.*, 2013, EMBABY *et al.*, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulamentador sobre a qualidade dos alimentos no Brasil, orienta que as enzimas de origem microbiana, aplicadas na indústria de alimentos e bebidas, devem ser obtidas a partir de micro-organismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e empregando métodos e condições que garantam a fermentação controlada e impeçam a formação de substâncias tóxicas ou indesejáveis (BRASIL, 2010).

Conforme legislação brasileira vigente (BRASIL, 2009), que aprova a lista de enzimas permitidas para uso como coadjuvante alimentício destinado ao consumo humano, define que a origem das enzimas produzida por meio de uma fermentação deve provir dos micro-organismos das espécies: *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium simplicissimum*, *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*. A legislação orienta que para produção da enzima poligalacturonase, pectina estererase e pectinálise, *A. niger* deve ser o único micro-organismo utilizado para produção destas enzimas. A legislação salienta também, que as enzimas produzidas por micro-organismos geneticamente modificados

devem ser purificadas, sem formas viáveis dos organismos que as produziram e, ainda, sem traços de material genético (ácidos nucleicos).

Entre as vantagens da utilização do CES têm-se o menor risco de contaminação por bactérias e leveduras, obtenção de matéria-prima de menor custo e de fácil recuperação da enzima extra-celular, micélio e esporos, requer baixa energia e menor quantidade de água, obtêm alta produtividade e torna-se habitat natural para diversos micro-organismos, principalmente fungos (LU *et al.*, 1997; PANDEY *et al.*, 2000; DURAND, 2003; PANDEY, 2003; COUTO e SANROMÁN, 2006; DÍAZ, 2007; WANG e YANG, 2007; TORTORA *et al.*, 2012).

Dentre as desvantagens, citam-se a maior dificuldade no controle de processo (umidade, pH, temperatura, condições de nutrientes e concentração gasosa), dificuldades em *scale-up*, baixa homogeneidade da mistura e alta quantidade de impurezas, aumentando o custo de recuperação. A homogeneização pode auxiliar na transferência de massa e calor, porém a força causada pelo movimento pode ter efeitos adversos na porosidade do meio. Portanto, o *design* de um biorreator a ser utilizado em escala industrial, para produção de produtos utilizando tecnologia de CES, é um fator significativo (DURAND, 2003; RAGHAVARAO *et al.*, 2003; COUTO e SANROMÁN, 2006; DÍAZ *et al.*, 2007; WANG e YANG, 2007).

Em face disso, o sucesso da produção comercial de enzimas depende da maximização da atividade do micro-organismo e da minimização dos custos do substrato e da incubação. Muitos são os fatores que influenciam no processo de fermentação para obtenção do produto desejado, como: tipo de micro-organismo, tamanho das partículas sólidas, pH do meio, temperatura de incubação, tempo de fermentação, umidade e fonte de nutrientes (PANDEY, 1991; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Os trabalhos da literatura visam avaliar em escala de bancada ou industrial, parâmetros inerentes ao bioprocessos e a maximização da produção enzimática. O Quadro 2 apresenta uma breve revisão, dos últimos oito anos de pesquisa sobre o aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção pectinases em CES, o respectivo micro-organismo e algumas variáveis do processo de bioprodução.

Quadro 2: Produção de enzimas pectinolíticas em diferentes resíduos sólidos.

Suporte/Substrato	Enzima	Micro-organismo	Atividade enzimática (tempo de fermentação)	Umidade	Inóculo (esporos por grama)	Referência
Polpa de beterraba açucareira	Exo-PG	<i>A. sojae</i> ATCC 20235	909,5 U/g _{bs} (8 dias)		2×10^7	HEERD <i>et al.</i> (2014b)
Casca de melancia	PG	<i>T. virens</i>	~140 U/g _{bu} (4 dias)	70 %	5×10^5	MOHAMED <i>et al.</i> (2013)
Casca de melão (<i>cantaloupe</i>)		<i>T. harzianum</i>				
Pomace uva branca	Exo-PG	<i>A. awamori</i>	3,2 U/g _{bs} (6 dias)	70 %	$4,5 \times 10^8$	DÌAZ <i>et al.</i> (2012)
Casca de laranja			16,9 U/g _{bs} (14 dias)			
Mistura pomace uva branca e casca de laranja (1:1)			3,8 U/g _{bs} (4 dias)			
Farelo de trigo e casca de laranja na proporção de 70:30	Exo-PG Endo-PG Exo-PMG Endo-PMG	<i>A. sojae</i> ATCC 20235	28,3 U/g _{bs} (5 dias) 30,1 U/g _{bs} (5dias) 33,4 U/g _{bs} (5dias) 32,9 U/g _{bs} (5dias)		$2,0 \times 10^7$	HEERD <i>et al.</i> (2012)
Bagaço de cana e bagaço de laranja lavado (1:3)	Pectinase	<i>Aspergillus sp.</i>	77 U/g _{bs} (19 h)	70 %	$1,0 \times 10^7$	BIZ (2012)
Farelo de trigo	PMGL	<i>Oidiodendron echinulatum</i> MTCC 1356	0,21 U/mL (6 dias)		$5,0 \times 10^6$	YADAV <i>et al.</i> (2012)
Polpa de citrus	Exo-PG	<i>A. niger</i> F3	265,0 U/g _{bs} (3 dias)	60 %		RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ <i>et al.</i> (2011)
Farelo de trigo	Endo-PG	<i>A. niger</i> t0005/007-2	78 U/g _{bs}	60 %	$1,0 \times 10^7$	HENDGES <i>et al.</i> (2011)

Quadro 2: Continuação.

Farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1)	PGL	<i>P.viridicatum</i> RFC3	300,0 U/g (96 h)	70 %	$1,0 \times 10^7$	FERREIRA <i>et al.</i> (2010)
Casca de manga	PG	<i>Fusarium moliniforme</i>	43,2 U/g (120 h)	58 %		KUMAR <i>et al.</i> (2010)
Bagaço do pedúnculo de caju	PG	<i>A. niger</i> CCT 0916	11,0 U/g _{bu} (71 h)	50 %	$1,0 \times 10^7$	ALCÂNTARA <i>et al.</i> (2010)
Albedo e casca de Maracujá	PG	<i>A. niger</i> CCT 0916	20,9 U/g _{bs} (66 h)	40 %	$1,0 \times 10^7$	SOUZA <i>et al.</i> (2010)
Farelo de trigo, pectina cítrica, glicose e nutrientes	Endo-PG	<i>A. niger</i> T0005/007-2	107,2 U/g (4 d)	53 %	$1,0 \times 10^6$	POLIDORO (2009)
Pedúnculo de caju	PG	<i>A. niger</i> CCT 0916	16,0 U/g _{bu} (16 h)	40 %	$1,0 \times 10^7$	SANTOS <i>et al.</i> (2008)
Pomace de uva	Exo-PG	<i>A. awamori</i>	42,5 U/g _{bs} (24 h)	60 %	$4,5 \times 10^5$	DÍAZ <i>et al.</i> (2007)
Pomace de uva	Exo-PG	<i>A. awamori</i> 2B.361 U2/1	38,0 U/g (2 dias)	65 %	$0,3-5 \times 10^5$	BOTELLA <i>et al.</i> (2007)
Bagaço de laranja seco e farelo de trigo	Exo-PG	<i>P. viridicatum</i> RFC3	17,0 U/mL (12 dias)	80 %	$1,0 \times 10^7$	SILVA <i>et al.</i> (2007)
Milho esmagado	PG	<i>A. sojae</i> ATCC 20235	29,1 U/g meio sólido (6 dias)	50 %	$2,3 \times 10^7$	USTOK <i>et al.</i> (2007)
Capítulo de girassol	Exo-Pectinase Endo-pectinase	<i>A. niger</i> DMF45	17,0 U/g (4 dias) 5,0 U/g (4 dias)	65 %	$1,0 \times 10^7$	PATIL e DAYANAND (2006)
Farelo de trigo e resíduo de maracujá (2:1)	PG	<i>A. niger</i> mutante 3T5B8	63,9 U/g _{bs} (64 h)	62 %	$1,0 \times 10^7$	MENEZES (2006)
Farelo de trigo e casca de laranja (1:1)	Exo-PG	<i>Aspergillus</i> sp N12	10,0 U/mL (72 h)	70 %	$1,0 \times 10^7$	FREITAS <i>et al.</i> (2006)

Além das referências citadas no Quadro 2, outras referências apresentam a produção de enzimas pectinolíticas utilizando diversos resíduos agroindustriais em CES (CASTILHO *et al.*, 2000; ZHENG e SHETTY, 2000; MARTINS *et al.*, 2002) e em cultivo submerso (SOLÍS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2005a; PEDROLI, *et al.*, 2009; KHAIRNAR *et al.*, 2009; BUYUKKILECI *et al.*, 2011; MALLER *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-TRUJILLO *et al.*, 2011).

Dentre os resíduos agroindustriais sólidos, utilizados para a produção de pectinases por CES, destacam-se o bagaço e casca de laranja, farelo de trigo, casca de uva, casca de limão e o bagaço de maçã. Muitos destes substratos são utilizados em CES por serem importantes fontes de carbono e proteína (MARTÍNEZ-TRUJILLO *et al.*, 2011; RODRIGUEZ FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A presença de pectina no meio fermentativo é importante, pois esta apresenta efeito indutivo e favorece a síntese das pectinases pelos micro-organismos produtores (THAKUR *et al.*, 1997; SORIANO, 2005). O farelo de trigo é rico em vitaminas e sais minerais, além de ser fonte de amido, proteína bruta e polissacarídeos de parede celular, possui uma grande área superficial por volume e, em geral, não favorece a compactação do meio de cultivo (CARRÉ e BRILLOUET, 1986; RALET *et al.*, 1990).

A seleção do meio de cultivo utilizado na produção de pectinases por CES depende de diversos fatores, sendo, o de maior impacto, o custo e a disponibilidade do substrato, o que torna bastante atrativa a utilização de resíduos agroindustriais. É importante que o meio sólido forneça os nutrientes necessários ao crescimento celular (KAPOOR e KUHAD, 2002). Por isso, muitas vezes deve-se enriquecer os substratos escolhidos com soluções de sais minerais e vitaminas ou tornar seus componentes mais disponíveis, por meio de pré-tratamentos químicos ou físicos. Em alguns processos, pode ser necessário remover compostos que possam agir como inibidores (PANDEY *et al.*, 2000).

O percentual de umidade do meio varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade de cada espécie de micro-organismo utilizado no CES. Fungos necessitam de um valor de umidade entre 40 e 60 % para seu crescimento e metabolismo. Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento do risco de contaminação, redução no volume de gases e de troca gasosa (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Frente a isso, diversas são as dificuldades envolvidas em mensurar os parâmetros de crescimento dos micro-organismos em CES, incluindo análise de crescimento celular e

determinação da composição do meio, por causa da heterogeneidade da natureza do substrato, principalmente em subprodutos agroindustriais, que são compostos complexos estruturalmente e nutricionalmente.

Botella *et al.* (2007) avaliaram o efeito do tamanho da partícula, teor de umidade e da suplementação na produção de pectinase e xilanase, durante 7 dias de bioprodução, por *A. awamori* 2B.361 U2/1, utilizando como substrato pomace¹ de uva, sendo que a melhor condição foi com 65 % de umidade. Díaz *et al.* (2012) estudaram a produção de exo-PG utilizando como substrato pomace¹ de uva branca e casca de laranja seca, analisando isoladamente ou mistura na proporção de 1:1 (m/m). A melhor resposta foi observada quando usando apenas casca de laranja como substrato, em 14 dias de bioprodução (16,9 U/g_{bs}).

¹O termo “Pomace” refere-se ao produto obtido de fontes agro-industriais, principalmente casca de citrus e bagaço de maçã obtido após um pré-tratamento térmico seguido de diversas lavagens para diminuir a concentração de açúcar e ácido antes da secagem (RODRÍGUEZ-JASSO, 2003 *apud* RUIZ *et al.*, 2012).

Ustok *et al.* (2007), utilizando-se da ferramenta planejamento experimental na produção da PG, avaliaram a interação entre os substratos sólidos (sabugo de milho, milho e milho esmagado) e obtiveram a máxima produção de PG (29,1 U/g) após 6 dias de bioprodução, por *A. sojae* ATCC 20235, empregando milho esmagado.

Heerd *et al.* (2012) pesquisaram a produção de exo e endo-(PMG e PG) por três espécies de *Aspergillus* inoculados em farelo de trigo e casca de laranja na proporção de 70:30 (m/m), sendo que após 5 dias de bioprodução, *A. sojae* ATCC 20235 (re-classificado como *A. oryae*) foi o agente biológico que produziu a maior atividade (30 U/g_{bs}), para ambas as enzimas.

Outra variável importante que influencia no processo de fermentação é o tamanho da partícula. O meio de cultivo deve conter partículas de tamanho reduzido para promover área superficial maior e consequentemente maior grau de transformação; porém se forem pequenas demais, pode ocorrer a compactação do substrato, dificultando a aeração do meio. Porções maiores promovem mais espaço interpartículas, diminuindo o rendimento e a absorção dos nutrientes pelos micro-organismos (ALCÂNTARA *et al.*, 2007). Em estudo realizado por Ruiz *et al.* (2012), utilizando quatro tipos de peneiras (*mesh* 10, 25, 50 e 180) para seleção de 8 espécies de fungos filamentosos (sete do gênero *Aspergillus* e um do gênero *Penicillium*), observaram que o melhor crescimento celular foi quando utilizaram

partículas com *mesh* 25 (0,7 a 2,0 mm) e o agente biológico *A. niger* Aa-20, sendo isto atribuído a maior área específica, porosidade e condições de aeração.

Em determinados casos, torna-se necessário a suplementação com minerais específicos, os quais devem ser adicionados aos substratos, visando maximizar a produção enzimática (FELLOWS, 2006). Yadav *et al.* (2012) e Kashyap *et al.* (2003) investigaram a produção da pectinase em CES suplementado com sais minerais. A adição de Ca e Mg aumentou consideravelmente a produção da enzima pectinolítica.

Outro aspecto importante, no processo de CES, é a recuperação adequada dos metabólitos bioproduzidos que envolvem a extração sólido-líquido, empregando diferentes solventes e parâmetros experimentais, como: temperatura, tempo, pH, razão sólido-líquido, tamanho de partícula, agitação e polaridade do solvente (BIZ, 2012; BAIANO, 2014). O processo de extração sólido-líquido consiste na dissolução preferencial de um ou vários solutos de interesse, por meio do contato entre um sólido e um líquido. Portanto, é interessante avaliar tipos de solutos e suas interações, observando em grande parte a difusividade do soluto na fração do solvente ou solução extratora selecionada (RODRIGUEZ-FERNANDÉZ, 2009).

As pectinases são enzimas extracelulares em sua maioria e o solvente utilizado no processo de extração é geralmente água destilada ou tampão acetato e citrato (em diferentes valores de pH) e sais (com força iônica diferenciada, como NaCl e CaCl). O volume da solução, em mililitros, é de 5 a 20 vezes a massa de substrato seco, em gramas, e o tempo de exposição varia de 10 min a 1 h, com ou sem agitação. A temperatura de extração varia de 4 a 45°C (CASTILHO *et al.*, 2000; DÍAZ *et al.*, 2007; BIZ, 2012). A eficiência de extração é um fator crítico que determina a viabilidade econômica da fermentação para produção de enzimas. Contudo, a recuperação de enzimas produzidas por fungos filamentosos em CES visam à minimização de custos e tempo, maximização de rendimento e produtividade.

2.4 BIOFILME BACTERIANO

Biofilme pode ser definido como uma comunidade de células microbianas, praticamente constituída por bactérias, aderidas às superfícies, que por sua vez, são envolvidas por uma camada de partícula de matéria orgânica, caracterizada como matriz de

substâncias poliméricas extracelular – EPS (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; ANDRADE, 2008; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

A composição da matriz varia entre espécies e depende do nicho ecológico que os micro-organismos habitam. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são micro-organismos psicrotróficos que causam deterioração principalmente em produtos lácteos líquidos pasteurizados e apresentam a característica de formação de biofilme em diferentes superfícies (SIMÕES *et al.*, 2010; MASÁK *et al.*, 2014).

Pseudomonas sp. produzem variados componentes da matriz do biofilme, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (MANN e WOZNIAK, 2012). Proteínas e carboidratos encontram-se em 75-89 % da composição dos EPS do biofilme (SIMÕES *et al.*, 2010). Alginato, celulose, Psl (*polysaccharide synthesis locus*, rico em manose) e Pel (rico em glicose) são os principais polissacarídeos encontrados na matriz de biofilmes bacterianos (MANN e WOZNIAK, 2012).

A formação de biofilmes tem implicações substanciais em processos industriais, em segmentos da área de alimentos, têxtil, celulose e médica. A presença de biofilmes é um fator de risco relevante na indústria de alimentos e bebidas, devido à contaminação cruzada de produtos alimentares por micro-organismos patogênicos e deteriorantes (HOUDT e MICHIELS, 2010). Talvez, o ambiente onde as pessoas mais estão expostas a biofilmes é o ambiente doméstico (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

Normalmente os biofilmes são formados pela negligência da execução da etapa de higienização, principalmente em locais de difícil acesso, como gaxeta, válvulas e curvas de tubulações. O ideal é prevenir e controlar a formação de biofilmes utilizando técnicas de higienização das superfícies da linha de processamento de alimentos e bebidas, materiais de superfícies polidos e incorporados com agentes antimicrobianos, ferramentas de controle de qualidade e manipuladores treinados (SIMÕES *et al.*, 2010).

Como estratégia, visando à tecnologia limpa, pesquisas que impeçam a adesão e facilitem a remoção de biofilmes bacterianos, vem sendo realizadas nas últimas décadas (HOUDT e MICHIELS, 2010; MEERVENNE *et al.*, 2014; WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). A utilização de detergentes à base de enzimas como bio-produtos de limpeza pode servir como uma opção viável para resolver o problema de biofilme na indústria alimentos e bebidas e de impacto ambiental.

Devido à heterogeneidade da EPS e do modo de ação das enzimas, um *mix* de enzimas (liases e hidrolases) podem ser úteis na degradação do biofilme. Portanto,

formulações contendo enzimas diferentes parecem ser fundamentais para o seu controle (SIMÕES *et al.*, 2010; ZANAROLI *et al.*, 2011). Como perspectiva, biocompostos poderiam ser produzidos e otimizados com o propósito de degradar a matriz do biofilme, contribuindo para a eficiência da etapa de higienização e para serem utilizadas em determinadas circunstâncias industriais (JOHANSEN *et al.*, 1997; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; ORGAZ *et al.* 2006; CORDEIRO e WERNER, 2011; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, o Brasil criou o Comitê Nacional de Biotecnologia (BRASIL, 2007), que inclui entre as ações estruturantes: desenvolver tecnologia enzimática para a produção de produtos úteis e de maior valor agregado; desenvolver tecnologias apropriadas para produção de enzimas em grande escala por processos fermentativos e extrativos, utilizando a biodiversidade brasileira como fonte de biocatalisadores; estimular o uso de enzimas em segmentos industriais, tais como alimentício, detergentes, farmacêutico, têxtil, celulose e papel e também no tratamento de efluentes e resíduos.

Frente a isto, visto que o rendimento da produção da enzima é influenciado por diversos fatores e que a tecnologia de CES oferece a possibilidade de aproveitamento dos resíduos agroindustriais sólidos, desta forma, minimizando os efeitos da poluição gerados pelas indústrias do setor alimentício, este trabalho apresenta alternativa de valorização de resíduos agroindustriais para a produção e aplicação de enzimas pectinolíticas, com vistas ao constante avanço e otimização de produtos, focando no atendimento às demandas da sociedade e considerando seus aspectos econômicos, éticos e ambientais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta as metodologias utilizadas para a otimização e/ou maximização do processo de bioprodução, extração e caracterização das enzimas pectinolíticas (exo-PG, PME e PMGL), bem como, para a aplicação do extrato bruto enzimático.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

A casca de laranja, gênero *Citrus*, variedade Valência (resíduo da produção de suco) e o farelo de trigo (*Triticum aestivum*) foram obtidos de estabelecimento comercial local (Erechim, RS). A água de maceração de milho foi cedida pela empresa *Ingredion* Brasil (Mogi Guaçu, SP). O resíduo da casca de laranja foi previamente preparado, as sementes e as partes internas da casca (endocarpo) foram removidas manualmente. A casca (albedo e flavedo, umidade de 75 %) foi triturada em processador de alimentos (Walita, modelo Master). O farelo (umidade de 11 %) e a água de maceração de milho (umidade de 56 %) foram utilizados na forma adquirida.

Para caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais, utilizados no processo de bioprodução de pectinases (casca de laranja, farelo e água de maceração de milho), foram realizadas análises de pH, atividade de água, minerais totais, pectina, K, Cu, Cr, Zn, Cd, Na, Al, Mg, Fe, Ca, Mn e N₂.

3.2 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE BIOPRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PECTINASES

3.2.1 Micro-organismo

A cepa do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi o agente biológico utilizado na bioprodução de enzimas pectinolíticas, cultivado em meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA, Acumedia) durante sete dias, a 28 °C. Os esporos foram preservados sobre refrigeração até seu uso, não excedendo o prazo de 30 dias.

Visando manter a concentração de esporos na mesma ordem de grandeza e específica para cada fermentação, foi realizada a sua contagem (FREIRE, 1996) em Câmara de

Neubauer espelhada (LO-Laboroptik Ltd, modelo *Neubauer Improved*). Ao o frasco de *Erlenmeyer* contendo os esporos, 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v) e pérolas de vidro foram adicionadas para extração. Para facilitar a remoção, uma leve agitação foi realizada e a suspensão foi transferida para um frasco de *Erlenmeyer* esterilizado. Alíquota de 1 mL, desta suspensão, foi diluída de 10 a 10^3 vezes em solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v). A contagem dos esporos foi realizada utilizando câmara de *Neubauer* e microscópio óptico (Leica, modelo DMIL). Em seguida, a suspensão de esporos foi diluída em água e inoculada ao meio de cultivo em concentrações específicas para cada estudo. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (Pachane, modelo PA 310) e com material previamente esterilizado.

3.2.2 Cultivo estado sólido

O cultivo estado sólido (CES) foi realizado em béquer de polipropileno de 500 mL, contendo uma mistura composta por casca de laranja triturada, farelo de trigo e água de maceração de milho em concentração específica para cada etapa em estudo. Cada béquer foi coberto com manta bacteriológica e recoberto com folha laminada, esterilizado em autoclave vertical (Phoenix, modelo AV75) por 15 min a 1 atm, seguido de resfriamento a temperatura ambiente.

Em seguida, uma alíquota (1:10, v:m) de suspensão de esporos, contendo a concentração desejada para cada ensaio, foi inoculada sobre a mistura de substratos. O meio de cultivo foi incubado em câmara de germinação (Tecnal, modelo TE401) a temperatura de 30 °C, com umidade relativa e tempo de bioprodução controlados, conforme condição de cada experimento. Ressalta-se, que para manter a umidade relativa do meio foi injetado ar úmido saturado.

3.2.3 Avaliação de fatores que influenciam a bioprodução

Experimentos preliminares foram realizados para avaliar os fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar na bioprodução de exo-PG, tais como a concentração de esporos, umidade, pH do meio e tempo de bioprodução. Nestes ensaios, fixou-se o meio de bioprodução em 16 g de casca de laranja triturada, 2 g de farelo de trigo, 2 g água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m). Para extração da enzima exo-PG, utilizou-se 10 g de

meio cultivado, diluído em 50 mL de solução de 0,1 mol/L de NaCl (Sigma), sendo esta mistura homogeneizada a 175 rpm, 20°C e durante 30 min. O sobrenadante obtido foi transferido para tubo tipo *Falcon* (50 mL), procedendo à centrifugação (MPW Med. Instruments, modelo 351R), nas condições de 4.000 rpm, por 15 min a 4°C, seguido da análise da atividade enzimática.

a) Concentração de esporos no inóculo: Para avaliar se a quantidade de esporos apresentava algum efeito na produção da exo-PG, foram realizados estudos em diferentes concentrações de esporos (5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 e 5×10^7 esporos de *A. niger* ATCC 9642 por grama de meio úmido) e tempos de bioprodução (24, 48, 72 e 96 h).

b) Teor inicial de umidade: O teor de umidade é um fator determinante no crescimento dos micro-organismos, portanto foi analisada a influência do teor de umidade na produção enzimática de exo-PG em diferentes tempos de bioprodução (24, 48, 72 e 96 h). A casca de laranja triturada foi dessecada em estufa (Marconi, modelo MA 037) a 50 °C, com renovação e circulação de ar, por 48 h. Realizaram-se, também, experimentos com a casca *in natura*. O meio de bioprodução, composto por casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho, na proporção de 8:1:1 (m:m:m), foi ajustado o teor de umidade para 30, 40, 50, 60 e 70 % (b.u.). A quantidade volumétrica de água foi dimensionada através de cálculo de balanço de massa, descontando a umidade inicial da mistura e a alíquota de suspensão de esporos.

c) Tempo de bioprodução: Para avaliar a produção enzimática ao longo do tempo (240 h), ensaios foram realizados fixando a umidade e concentração de esporos das melhores condições obtidas nos experimentos anteriores.

d) pH inicial do meio de bioprodução: Ensaios de produção de exo-PG foram realizados em diferentes pH (2,5 a 6,5) do meio de bioprodução, ajustando o pH com soluções tampão de 0,2 mol/L de citrato-ácido clorídrico (2,5-4,0) e fosfato-hidróxido de sódio (4,5-6,5). O tempo de fermentação foi de 96 h.

3.2.4 Avaliação dos fatores que influenciam no processo de extração

Primeiramente, foram testados solventes e soluções extratoras, com forças iônicas diferenciadas, no processo de extração de exo-PG, PME e PMGL, para a melhor condição de bioprodução obtida nos ensaios realizados anteriormente (item 3.2.3). Água destilada, NaCl (0,1 mol/L), tampão citrato (0,005 mol/L, pH 5,4), tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0) e Tween 80 (0,1 % v/v) foram os solventes e soluções utilizados, sendo estes adicionados na razão de 5:1 (v:m) ao meio de cultivo e homogeneizados a 175 rpm, na temperatura de 20 °C e durante 30 min.

Na sequência, como estratégia para otimizar o processo de recuperação das enzimas, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 8 ensaios fatoriais, 6 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes foram: temperatura de extração (°C, X_1), tempo de contato (min, X_2) e frequência de agitação (rpm, X_3). A Tabela 2 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis. Considerou-se a medida da atividade enzimática (U/g_{bu}) de exo-PG, PME e PMGL como variável dependente (resposta).

Tabela 2: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da exo-PG, PME e PMGL.

Variáveis independentes	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0*	+1	+1,68
Temperatura (°C)	X_1	13,2	20	30	40	46,8
Tempo (min)	X_2	4,8	15	30	45	55,2
Frequência de Agitação (rpm)	X_3	12	80	180	280	348

* Triplicata do ponto central

Posteriormente, realizou-se a avaliação de diferentes ciclos de extração, da melhor condição obtida no planejamento fatorial completo 2^3 , visando à total extração das enzimas pectinolíticas (exo-PG, PME e PMGL) presentes no meio de bioprodução. Nesta etapa, também, avaliou-se a necessidade de efetivar a homogeneização após cada ciclo de extração. Desta forma, após a filtração, ao final de cada ciclo, o meio retido na peneira foi transferido para o frasco de *Erlenmeyer*, adicionando 25 mL de solvente/solução extratora e homogeneizado mecanicamente em agitador orbital (New Brunswick Scientific, modelo Excella E25), com controle da frequência de agitação, temperatura e tempo, nas condições

otimizadas de cada enzima em estudo (Tabela 2). Nos ensaios com o meio não homogeneizado (estático), realizou-se a filtração de cada ciclo adicionando 25 mL do solvente/solução extratora diretamente na peneira onde se encontrava o meio de cultivo fermentado.

Após cada ciclo, o sobrenadante obtido foi transferido para um tubo tipo *Falcon* (50 mL), procedendo-se a centrifugação (MPW Med. Instruments, modelo 351R) nas condições de 4.000 rpm, por 15 min a 4°C e realizada a análise da atividade enzimática. A Figura 3 apresenta um fluxograma esquemático das etapas da bioprodução e extração enzimática.

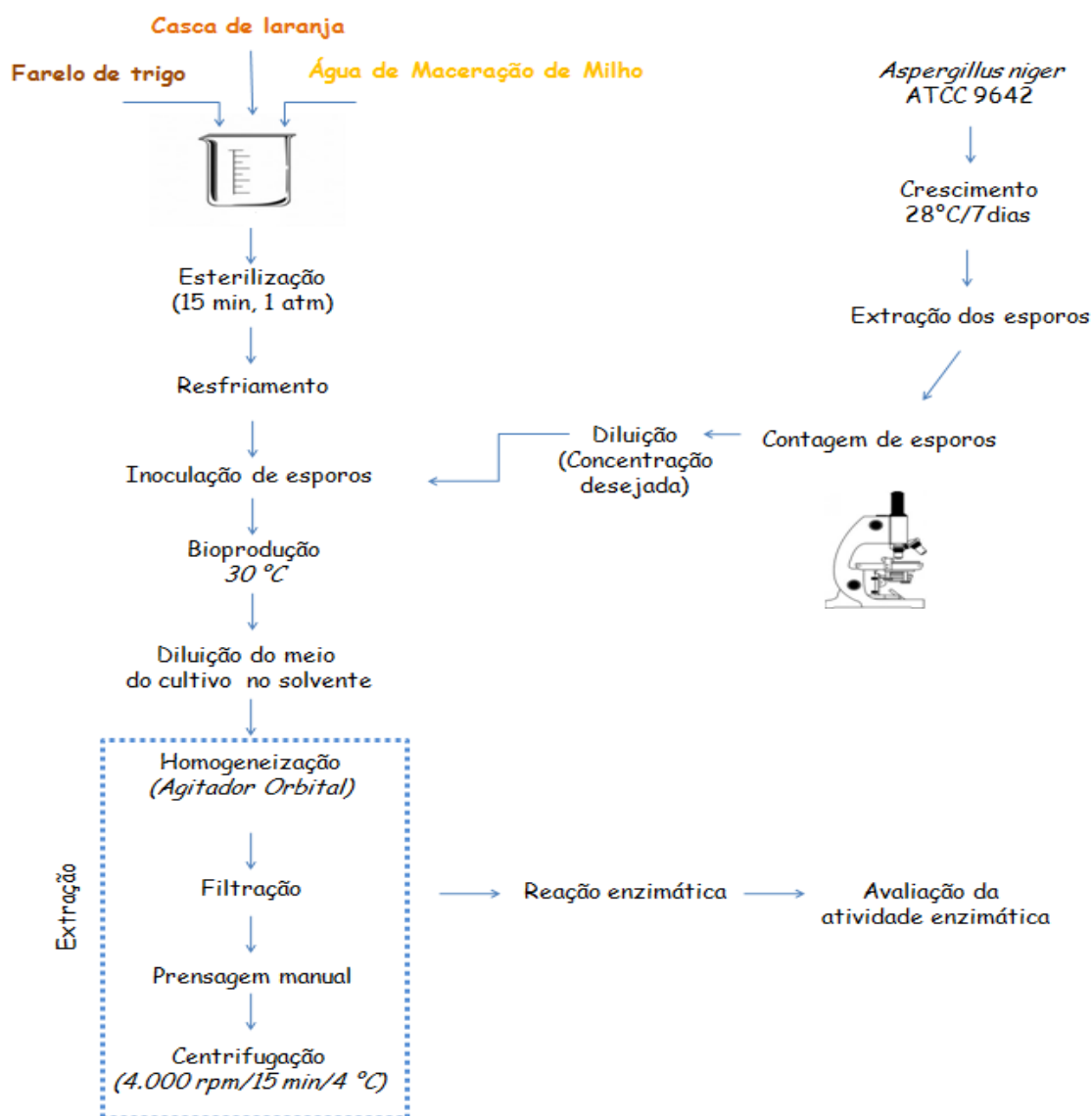


Figura 3: Fluxograma das etapas de produção em cultivo estado sólido por *A. niger* ATCC 9642 e extração enzimática.

3.3 MAXIMIZAÇÃO E/OU OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE PECTINASES

Os efeitos da composição do meio de cultura no processo de CES foram avaliados através de um planejamento fatorial completo 2^3 (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 8 ensaios fatoriais, 6 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes estudadas foram: concentração de casca de laranja triturada (g, X_1), farelo de trigo (g, X_2) e água de maceração de milho (g, X_3), conforme demonstrada na Tabela 3. Como variáveis independentes foram fixadas a concentração de esporos (5×10^6 por grama de substrato), umidade (65%), tempo (96 h) e a temperatura (30°C) de bioprodução. Como variáveis dependentes (respostas) avaliaram-se as atividades de exo-PG, PME e PMGL (U/g_{bu}).

Tabela 3: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para a bioprodução de exo-PG, PME e PMGL.

Variáveis independentes**	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0*	+1	+1,68
Casca de laranja (g)	X_1	9,28	12	16	20	22,72
Farelo de trigo (g)	X_2	0	0,81	2	3,19	4
Água de maceração de milho (g)	X_3	0,32	1	2	3	3,68

* Triplicata do ponto central; **Variáveis independentes fixas: concentração de esporos 5×10^6 por grama de substrato úmido, umidade 65%, 96 h e temperatura 30°C.

Baseado nos resultados obtidos no planejamento 2^3 , um novo planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado para a produção da exo-PG, deslocando-se os níveis das variáveis independentes água de maceração de milho (g, X_1) e farelo de trigo (g, X_2) e fixando-se o teor de casca de laranja (9 g), concentração de esporos (5×10^6 esporos/g_{bu}), umidade (65%), tempo (96 h) e temperatura (30°C) de bioprodução.

O Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) incluiu 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. A Tabela 4 apresenta os níveis das variáveis independentes estudados no planejamento fatorial completo 2^2 . Como variável dependente (resposta) avaliou-se a atividade enzimática de exo-PG (U/g_{bu}).

Tabela 4: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2² para a bioprodução de exo-PG.

Variáveis independentes**	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Água de maceração de milho (g)	X ₃	3,7	4,66	7	9,34	10,3
Farelo de trigo (g)	X ₂	0	1,16	4	6,48	7,5

* Triplicata do ponto central; **Variáveis independentes fixas: 9 g de casca de laranja, concentração de esporos 5x10⁶ por grama de substrato, umidade 65%, 96 h e temperatura 30°C.

O estudo cinético foi realizado a partir das condições experimentais otimizadas/maximizadas de bioprodução da exo-PG (9 g de casca de laranja, 4 g de farelo de trio, 7 g de água de maceração de milho), PME (12 g de casca de laranja, 0,81 g de farelo de trio, 7 g de água de maceração de milho) e PMGL (16 g de casca de laranja, 2 g de água de maceração de milho), tendo como objetivo, avaliar a atividade das enzimas exo-PG, PME e PMGL, consumo de açúcares redutores totais (ART), concentração celular (biomassa) e o pH em função do tempo. As amostras foram coletadas periodicamente a cada 12 h, durante 204 h de bioprodução.

3.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PECTINASES

Para a caracterização parcial das enzimas presentes no extrato bruto foi determinado a temperatura e o pH ótimo de reação através da realização de um planejamento fatorial completo 2². Para avaliação da estabilidade, o extrato enzimático foi submetido a diferentes condições de temperatura, pH e tempos de incubação, definidos com base em relatos de literatura (ANDRADE *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2011; DAMÁSIO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2012; ZENI *et al.*, 2013; ZENI *et al.*, 2014).

3.4.1 Avaliação da temperatura e pH ótimos

Para a determinação dos valores ótimos de temperatura e pH das pectinases, nas condições maximizadas/otimizadas, foi realizado um planejamento fatorial completo 2², onde o pH variou de 3 a 6 e a temperatura de 30 a 80°C para as enzimas exo-PG e PMGL (Tabela 5) e, para a enzima PME os valores de pH variaram de 5,0 a 11,0 e a temperatura de 24 a 66°C (Tabela 6).

Tabela 5: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de pH e temperatura ótima das enzimas exo-PG e PMGL.

Variáveis Independentes**	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	+1	1,41
pH	X ₁	3	3,5	4,5	5,5	6
Temperatura (°C)	X ₂	30	37	55	73	80

* Triplicata do ponto central; **Variáveis independentes fixas: solvente de extração: NaCl 0,1 (mol/L), razão 10:1 (v:m); processo de extração: 180 rpm, 30 °C, 30 min (exo-PG) e 180 rpm, 30 °C, 55 min (PMGL)

Tabela 6: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de pH e temperatura ótima da enzima PME.

Variáveis independentes**	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	+1	1,41
pH	X ₁	3,02	4,2	7,0	9,8	11,0
Temperatura (°C)	X ₂	24	30	45	60	66

* Triplicata do ponto central; **Variáveis independentes fixas: **Variáveis independentes fixas: solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L), razão 10:1 (v:m); processo de extração: 180 rpm, 30 °C, 55 min.

O pH da solução de reação da exo-PG e PMGL foi ajustado com solução tampão acetato de sódio 0,2 mol/L e Tris-HCl 0,05 mol/L, respectivamente, e incubados em banho-maria (Nova Ética) nas diferentes temperaturas. Para análise da PME, o pH da solução de reação foi ajustado, titulando com solução de NaOH (0,01 mol/L).

3.4.2 Avaliação da temperatura e do pH de estabilidade enzimática

A fim de avaliar a estabilidade térmica das enzimas exo-PG, PMGL e PME, o extrato enzimático foi submetido a altas (40, 50, 60 e 70 °C) e baixas (-80, -10 e 4 °C) temperaturas. Em altas temperaturas, o extrato enzimático foi armazenado em um período de 24 h e determinado a atividade enzimática em intervalos de 1 h, durante 8 h, e após 24 h. Em baixas temperaturas o extrato bruto enzimático de exo-PG e PME foi armazenado durante 21 semanas nas temperaturas de -80 e -10 °C e durante 14 semanas a 4 °C. Para a análise de estabilidade de PMGL, o extrato bruto enzimático foi armazenado durante 10 semanas nas temperaturas de -80, -10 e 4 °C. Foi avaliada a atividade enzimática das

amostras, armazenadas a baixas temperaturas, em intervalos de 7 dias. A estabilidade frente à temperatura foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática.

Além de avaliar a estabilidade térmica, foi avaliado também, a estabilidade das enzimas exo-PG e PMGL frente a diferentes pH (3 a 8). Para tanto, o pH do extrato bruto enzimático, obtido da fermentação, foi ajustado. Soluções tampão contendo acetato de sódio (0,1 mol/L) foi utilizado para ajustar o pH do meio em 3,0, 4,0 e 5,0 e fosfato de potássio (0,1 mol/L) para os pH 6,0, 7,0 e 8,0, para a enzima exo-PG. Já, para o extrato enzimático do meio maximizado/otimizado da enzima PMGL, o pH foi ajustado aos valores de 3,0 a 8,0 utilizando a solução de Tris-HCl (0,05 mol/L). A temperatura de incubação da exo-PG e PMGL foi de 50 °C e 55 °C, respectivamente. A estabilidade frente ao pH foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática.

3.5 APLICAÇÃO DAS PECTINASES NA REMOÇÃO DE BIOFILMES

O extrato bruto enzimático obtido do cultivo de 16 g de casca de laranja, 2 g de farelo de trigo e 3,68 g de água de maceração de milho, após 96 h, foi avaliado quanto a capacidade de remoção de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp., isolado de resfriador de expansão de leite cru após processo de higienização (FLACH *et al.* 2014, 2015). Deste extrato bruto, foi quantificada a atividade das pectinases, exo-PG, PME, PMGL, xilanase, carboximetilcelulose (CMCase) e FPase, conforme metodologia analítica descrita no item 3.6.

A cepa de *Pseudomonas* sp. foi inoculada em Ágar Luria-Bertani (LBA) e subcultivada por duas vezes a 30 °C/24 h, para ativação das células. Em seguida foi efetuada uma suspensão de células em solução salina (NaCl 0,9 %) e a turbidez foi comparada à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A suspensão de células foi diluída em caldo LB (Luria-Bertani Broth) esterilizado visando à obtenção do inóculo inicial de 5×10^6 UFC/mL (Biofilme). Uma alíquota de 150 µL do inóculo inicial padronizado foi adicionada a cada cavidade da microplaca poliestireno de 96 cavidades (Olen, modelo K30-5096P) e incubada a 30 °C/24 h.

Na sequência, para remoção de células planctônicas, foi aspirado o meio de cultura das cavidades e lavado por duas vezes com 200 µL de solução salina (NaCl 0,9 N). Após, uma alíquota de 200 µL de extrato bruto enzimático foi aplicada sobre os biofilmes

previamente formados nas microplacas de poliestireno (96 cavidades), variando-se o tempo de contato (10, 15, 20, 30 min, 60, 120 e 360 min) e concentração do extrato enzimático (1:2,5, 1:5 e 1:7,5 - massa do meio fermentado:volume de solução NaCl 0,1 mol/L) e incubados a 30 °C. As cavidades foram lavadas com solução salina, para remoção das enzimas, adicionado metanol (99 %) para fixação das células, coradas com solução de cristal violeta, incubadas por 5 min e ressuspensado com ácido acético glacial (33 %). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (EL 900 Biotel Instrumens, INC.) a 490 nm (λ_{490}). Todos os ensaios foram realizados com controle de crescimento e de esterilidade. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de remoção de biofilme.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

A seguir serão descritas as determinações físico-químicas realizadas para caracterização dos substratos (avaliação e macro e micro-nutrientes, atividade de água, umidade inicial e pH), cinética de produção (ART, biomassa e pH) e os protocolos para avaliação das atividades enzimáticas (exo-PG, PME, PMGL, Xilanase, CMCase e FPase).

3.6.1 Açúcares redutores totais (ART)

Para determinação do teor de açúcares redutores totais utilizou-se o método descrito por Fontana *et al.* (2005) e Poletto (2015). Inicialmente, 1 g de meio úmido fermentado foi tratado com 10 mL de H₂SO₄ (1,5 mol/L) a 100 °C por 30 minutos. Após resfriamento, a suspensão foi neutralizada com NaOH (4 mol/L), tratada com soluções de ferrocianeto de potássio (15%) e sulfato cúprico (30%) a fim de promover a desproteinização e clarificação e filtrada. Os açúcares redutores totais foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico, DNS (Miller, 1959). A concentração de açúcar redutor foi determinada através da curva de calibração utilizando glicose na concentração de 0,01 e 0,1 g/mL. A absorbância das amostras foram medidas em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo 8453) a 545 nm (λ_{545}) e os resultados foram expressos em mg de açúcares redutores por grama de meio úmido fermentado (mg/g_{bu})

3.6.2 Atividade de água

A medida da atividade de água do meio de bioprodução foi realizada em equipamento (Aqualab, modelo CX 2), previamente calibrado com solução de NaCl (4,5 mol/L, a_w 0,882) na umidade de equilíbrio $25 \pm 0,5$ °C.

3.6.3 Atividade da exo-PG

A atividade da exo-PG foi mensurada pela quantificação dos grupos redutores, expressos em ácido galacturônicos liberados durante incubação de 0,8 mL de solução de pectina cítrica (0,5 % m/v, diluída em tampão acetato de sódio (200 mmol/L) e previamente aquecida em banho-maria, 37 °C, 15 min) e 0,2 mL do sobrenadante (extrato enzimático), por 6 minutos a 37 °C. Passado o tempo de reação, imediatamente, a cada tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959), encaminhou-os para aquecimento (banho de água em ebulição) por um período de 8 min (desnaturação da enzima e formação da cor) seguido de resfriamento em banho de gelo. Após, adicionou-se 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio-potássio (50 mmol/L, Vetec) procedendo-se à homogeneização e efetivação da leitura da medida da absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo 8453), no comprimento de onda de 540 nm (λ_{540}).

Realizaram-se ensaios de controle e pectina, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, porém sem adição pectina cítrica na solução tampão e do extrato bruto (adição de solução tampão), respectivamente. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$), nas condições de reação e segundo a curva padrão estabelecida, utilizando ácido α -D-galacturônico monoidratado (peso molecular 212,16 g/mol, Sigma) como açúcar redutor, na faixa de 0 a 1 mg/mL.

A atividade da exo-PG foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/g_{bu}) e calculado de acordo com a Equação 1.

Equação 1:

$$Exo-PG = [(ABS_{reação} - ABS_{pectina} - ABS_{extrato}) \times f \times d \times R] \div [PM \times t] \quad (1)$$

Onde: Exo-PG = Atividade da enzima exo-poligalacturonase (U/g_{bu});

$ABS_{reação}$ = Absorbância do extrato enzimático no meio reacional (enzima+substrato);

$ABS_{pectina}$ = Absorbância do substrato;

$ABS_{extrato}$ = Absorbância do extrato enzimático sem o substrato;

f = Fator de conversão da curva padrão (g/mL);

d = Diluição da enzima no meio reacional;

R = Razão solvente/meio fermentado na extração enzimática (mL/g);

PM = Peso molecular do ácido α -D-galacturônico monoindratado (212,16 g/mol);

t = Tempo de reação (min).

3.6.4 Atividade da PME

A atividade de pectina metilesterase (PME) foi determinada segundo método titulométrico descrito por Hultin *et al.* (1966). Um mililitro do sobrenadante (extrato bruto enzimático) foi adicionado sobre 30 mL de pectina cítrica (1 % m/v, diluída em NaCl 0,2 mol/L, pH 7,0, 30 °C $\pm$ 2). O pH da solução foi mantido em 7,0 $\pm$ 0,2 durante 10 min, titulando-se com NaOH (0,01 mol/L). Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 μ mol de NaOH min⁻¹ mL⁻¹, nas condições do ensaio. Realizaram-se ensaios de branco, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, porém utilizando água destilada com agente de reação. A atividade da PME foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/g_{bu}) e calculado de acordo com a Equação 2.

Equação 2:

$$PME = [V \times M \times R] \div [t] \quad (2)$$

Onde: PME = Atividade da enzima pectina metilesterase (U/g_{bu});

V = Volume gasto na titulação durante 10 min de reação a 30 °C e pH 7,0;

M = Molaridade do NaOH (0,01 mol/L);

R = Razão solvente/meio fermentado na extração enzimática (mL/g);

t = Tempo de reação (min).

3.6.5 Atividade da PMGL

A atividade da pectina liase (PMGL) foi determinada segundo método de Ayers *et al.* (1966), descrito por Pitt (1988). O método determina os produtos insaturados finais da degradação da pectina pelo ácido tiobarbitúrico. A mistura de reação, constituída de 5,0 mL da solução de pectina cítrica (1 % m/v, Sigma, diluída em tampão Tris-HCl (0,05 mol/L, pH 4,5), 1,0 mL da solução de CaCl₂ (0,01 mol/L), 1,0 mL do sobrenadante (extrato enzimático) e 3,0 mL de água destilada foi disposta em tubo tipo *Falcon*, homogeneizada e incubada por 20 min a 55°C. Passado o tempo de reação, adicionou-se a mistura, 0,6 mL de uma solução de ZnSO₄ 7.H₂O (9 % m/v) e 0,6 mL de NaOH (0,5 mol/L) e a mistura de reação foi centrifugada (4.000 rpm, 10 min, 5 °C; MPW Med. Instruments, modelo 351R). Em seguida, uma alíquota de 5 mL do sobrenadante (mistura de reação) foi transferida a um tubo de ensaio e adicionado 3,0 mL de ácido tiobarbitúrico (0,04 mol/L), 1,5 mL de HCl (0,1 mol/L) e 0,5 mL de água destilada. Os tubos foram fechados, encaminhados para aquecimento (banho de água em ebulição) por um período de 30 min e resfriados. Em seguida foi efetivada a medida de absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Agilent 8453) no comprimento de onda de 550 nm (λ_{550}). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorbância a λ_{550} , nas condições do ensaio (PITT, 1988). A atividade da pectina liase foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/g_{bu}). Realizaram-se ensaios de branco, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, porém sem adição pectina cítrica na solução.

3.6.6 Atividade da FPase

Para a enzima celulase, a atividade foi determinada como atividade de papel filtro (FPA) e expressa em unidades de papel filtro (FPU – Filter Paper Units) por volume de enzima original (GHOSE, 1987) e quantificada seguindo o método de DNS (MILLER, 1959), descrito em Astolfi (2014), nas condições de ensaio (tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,3, 50 °C, 60 min). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto ($U=\mu$ mol/min). A curva padrão foi estabelecida utilizando glicose nas concentrações de 0,1-6,7 mg/mL. A

atividade da FPase foi expressa em unidade de atividade por mL de extrato bruto enzimático (U/mL).

3.6.7 Atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade da enzima CMCase foi determinada pela medida dos açúcares redutores (GHOSE, 1987) seguido do método de DNS (MILLER, 1959), descrito em Astolfi (2014), nas condições de ensaio (tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, 50 °C, 30 min). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto ($U=\mu\text{mol}/\text{min}$), nas condições de reação e segundo a curva padrão, utilizando glicose nas concentrações de 0,1-6,7 mg/mL. A atividade para CMCase foi expressa em unidade de atividade por mL de extrato bruto enzimático (U/mL).

3.6.8 Atividade da Xilanase

A atividade da enzima Xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana (BAILEY *et al.*, 1992) e medida pelo método de DNS (MILLER, 1959), descrito em Astolfi (2014), nas condições de ensaio (tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,3, 50 °C, 5 min). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto ($U=\mu\text{mol}/\text{min}$). A curva padrão foi estabelecida utilizando xilose nas concentrações de 0,1-5,0 mg/mL. A atividade da xilanase foi expressa em unidade de atividade por mL de extrato bruto enzimático (U/mL).

3.6.9 Determinação da concentração celular (Biomassa)

Para determinação da concentração celular foi utilizado o método indireto descrito por Aidoo *et al.* (1981), mensurando a quantidade de glicosamina. Esse método pode ser observado em trabalhos realizados por Scotti *et al.* 2001, Desgranges *et al.* (1991), Valadão (2005), Zamani *et al.* (2008), Ruiz *et al.* (2012), Mohammadi *et al.* (2013), Chysirichote *et al.* (2014), Steudler e Bley (2015) e por Poletto (2015).

Para estimar a concentração celular (biomassa) em CES (mg de biomassa/g de meio fermentado úmido), seguiu-se a metodologia sugerida por Scotti *et al.* (2001) e descrita em Poletto (2015), na qual demonstraram que existe uma correlação definida entre a medida de glicosamina e a biomassa (concentração celular) obtida em condições submersas. Para tanto, primeiramente foi determinado o teor de glicosamina (mg) das amostras de micélio seco de *A. niger* ATCC 9642 cultivado em meio líquido, sendo que os valores obtidos foram correlacionados com a massa de biomassa seca do micro-organismo (mg).

Para a quantificação da glicosamina, adicionou-se 5 mL de solução de HCl (6 mol/L) a 0,5 g de amostra, sendo mantida em banho de água fervente por duas horas. Em seguida, a amostra foi resfriada e filtrada a vácuo. Do sobrenadante, transferiu-se 1 mL para um balão de 25 mL, adicionando uma gota de solução alcoólica de fenolftaleína (0,5%, p/v). Logo após, a neutralização foi efetuada titulando com solução de NaOH (3 mol/L), seguindo-se da titulação reversa, utilizando solução de KHSO₄ (1%) até a coloração rosa desaparecesse. O volume do balão foi completado para 25 mL utilizando água destilada. Para determinação do teor de glicosamina, 1 mL da solução resultante da hidrólise foi misturada a 1 mL do reagente acetilacetona (0,5 mol/L). A mistura foi mantida em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, 6 mL de etanol e 1 mL do reagente de *Erlich* foram adicionados à solução, seguido de aquecimento a 65 °C por 10 minutos. Os valores de absorbância foram medidos contra o branco, no comprimento de onda de 530 nm (λ_{530}), em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo 8453). Para a curva padrão, utilizou-se glicosamina como açúcar redutor na faixa de 0 a 0,05 mg/mL. Para determinação da biomassa fúngica (mg/g meio de fermentado) em CES foi determinado o valor de glicosamina do cultivo de *A. niger* ATCC 9642 em meio submerso na concentração de 0 a 0,5 g de biomassa seca.

3.6.10 Determinação de minerais totais componentes minerais

O teor de minerais totais foi determinado após a queima das amostras em mufla a 550°C, por 6 h (Instituto Adolfo Lutz, 2005). Os resultados foram expressos em porcentagem (% m/m).

Nitrogênio total foi determinado pelo método de *Kjeldahl* (VELP DK-20 e UDK-126D) segundo metodologia da AOAC (1995). Os teores de cobre, cromo, zinco, cádmio, alumínio, sódio, cálcio, 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. Para eliminar possíveis interferências foi adicionado cloreto de lantânio 1% na determinação de Mg e Ca, cloreto de potássio 25% para a determinação do Al e solução de Ca a 1000 ppm, para determinação do elemento Fe. Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrão. Os resultados foram expressos em mg/g_{bu} .

3.6.11 Quantificação de pectina

A determinação de pectina foi baseada no procedimento proposto por Rangana (1979). A extração da pectina foi realizada utilizando HCl (0,05 N), seguido de aquecimento (80-90 °C) por duas horas e mantendo-se o volume inicial constante. Após resfriamento a temperatura ambiente, a solução foi neutralizada com NaOH (0,1 N), adicionado 10 mL de NaOH (1 mol/L) e acondicionado por 12 h. Após esse procedimento, sob agitação constante, foi misturado 50 mL de ácido acético (1 mol/L) e mantido por 5 min. Passado este tempo, adicionou-se 25 mL de cloreto de cálcio (1 mol/L) e permaneceu-se em repouso por 1 (uma) hora. A amostra foi levada à ebulição por 2 min e filtrada. O precipitado foi lavado com água destilada fervente, para eliminação dos cloretos. Para verificação da presença destes cloretos, fez-se o teste usando uma solução de nitrato de prata (1%), até que o líquido filtrado não se tornasse turvo. O papel de filtro, previamente seco e pesado, com o precipitado, foi mantido em estufa a 105 °C até peso constante. As amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas. O teor de pectina foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final e expresso em porcentagem de pectato de cálcio.

3.6.12 pH

Preparou-se uma suspensão de 10 mL de água destilada e 1,0 g da amostra (mistura dos substratos). Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período

de 30 min, seguida da medida de pH que foi mensurada em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

3.6.13 Umidade

Para análise de umidade pesou-se aproximadamente 2 g do meio de bioprodução em cadinho de alumínio previamente dessecado em estufa (Odontobrás, modelo EL1.3) de renovação e circulação de ar a 105 °C por 24 h. O teor de umidade foi expresso em porcentagem, sendo calculado pela diferença de peso inicial e final da amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

3.6.14 Determinação dos fatores de produção, conversão e da produtividade do processo

A determinação dos fatores de produção específica, relacionada à formação de enzimas com a concentração celular no processo, conversão de substrato em produto, conversão de substrato em célula e produtividade mássica apresentam-se nas 3 a 6.

Equação 3:

$$Y_{P/X} = P_{max}/X_{max} \quad (3)$$

Onde: $Y_{P/X}$ = Fator de produção específica (U/mg);

P_{max} = Máxima atividade enzimática obtida no processo (U/g_{bu}).

Equação 4:

$$Y_{P/S} = P_{max}/(S_o - S_{P,max}) \quad (4)$$

Onde: $Y_{P/S}$ = Fator de conversão de substrato em enzimas (U/mg);

P_{max} = Máxima atividade enzimática obtida no processo (U/g_{bu});

S_o = Concentração inicial de substrato (mg/g_{bu});

$S_{P,max}$ = Concentração de substrato no instante em que ocorreu P_{max} (mg/g_{bu}).

Equação 5:

$$Y_{X/S} = X_{\max}/(S_0 - S_{X,\max}) \quad (5)$$

Onde: $Y_{X/S}$ = Fator de conversão de substrato em células (mg/mg);

$X_{\max}$ = Máxima concentração celular obtida no processo (mg/g_{bu});

S_0 = Concentração inicial de substrato (mg/g_{bu});

$S_{X,\max}$ = Concentração de substrato no instante em que ocorreu $X_{\max}$ (mg/g_{bu}).

Equação 6:

$$P_v = P_{\max}/T_{P,\max} \quad (6)$$

Onde: P = Produtividade mássica (U/g_{bu} /h);

$P_{\max}$ = Máxima atividade enzimática obtida no processo (U/g_{bu});

$T_{P,\max}$ = Tempo de processo em que ocorreu $P_{\max}$ (h).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos referente à atividade enzimática dos ensaios preliminares da bioprodução de exo-PG, das diferentes condições de extração, cinética de produção, caracterização e aplicação foram representados graficamente, mediante média (triplicata) e barra de erro (desvio padrão). Esses resultados foram tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as diferenças das médias pelo teste de Tukey com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, com nível de significância de 95 % de confiança.

Os resultados obtidos nos planejamentos fatoriais foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, ao nível de significância de 95 % de confiança. Para validação dos modelos foi utilizada a análise de variância, verificando-se o coeficiente de correlação e a amplitude de grandeza do $F_{\text{calculado}}$ em relação ao F_{tabelado} ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões referentes à otimização/maximização da produção e extração das pectinases exo-poligalacturonase (exo-PG), pectina metilesterase (PME) e pectina liase (PMGL) por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em cultivo estado sólido (CES), empregando casca de laranja (CL), farelo de trigo (FT) e água de maceração de milho (AMM) como substrato, bem como à caracterização parcial e aplicação do extrato bruto enzimático. Primeiramente, serão apresentados os resultados da caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais e dos efeitos da concentração de esporos, umidade, tempo de fermentação e pH na bioprodução de exo-PG. Em seguida, serão apresentados os resultados da otimização/maximização do processo de extração, recuperação e bioprodução e da caracterização parcial das enzimas exo-PG, PMGL e PME. Finalizando esse capítulo, será mostrado os resultados da aplicação do extrato bruto enzimático na remoção de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS

Diversos compostos proteicos e não proteicos podem exercer efeito inibitório, ou mesmo, indutor na produção das pectinases. Os principais componentes nutricionais dos resíduos agroindustriais são celulose, amido, lignina e a pectina. Durante o crescimento e a multiplicação dos micro-organismos, compostos de carbono são metabolizados e convertidos em biomassa e dióxido de carbono. Vários são os micro-organismos capazes de utilizar estas substâncias como fontes de carbono e de energia através da produção de uma vasta gama de enzimas (JOLIE *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2013).

A caracterização dos resíduos agroindustriais, visando à quantificação de micro e macronutrientes, utilizados como meio na bioprodução das enzimas pectinolíticas em cultivo estado sólido (CES) e pelo agente microbiológico *A. niger* ATCC 9624, apresentam-se nas Tabelas 7 e 8 e teve por objetivo caracterizar os resíduos em termos de pH, atividade de água, umidade, pectina e componentes minerais. Os valores foram expressos em base úmida.

Tabela 7: Características físico-químicas dos resíduos agroindustriais e no meio formulado.

Resíduo	Pectina (%, b.u)	Atividade de água	Umidade (%)	pH	Minerais Totais (%, b.u.)
Casca de laranja	3,38 ± 0,46	0,99 ^a ± 0,01	76,40 ^a ± 0,17	4,88 ^b ± 0,07	0,93 ^d ± 0,16
Farelo de trigo	-	0,72 ^c ± 0,02	13,65 ^d ± 0,23	6,89 ^a ± 0,02	4,03 ^b ± 0,48
AMM	-	0,93 ^b ± 0,01	57,40 ^c ± 0,80	4,18 ^c ± 0,14	7,45 ^a ± 0,97
Meio*	-	0,98 ^a ± 0,01	65,38 ^b ± 0,09	4,31 ^c ± 0,08	2,67 ^c ± 0,07

Médias (b.u. - base úmida) ± desvio padrão seguidas de letras iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa ao nível de 95% de confiança (Teste de Tukey). *Meio de cultivo: 16 g de casca de laranja triturada, 2 g de farelo de trigo e 2 g de água de maceração de milho.

Tabela 8: Teores de componentes minerais nos resíduos agroindustriais e no meio formulado.

Componentes minerais	Resíduos e meio de brioprodução* (mg/g _{bu})			
	Casca de laranja	Farelo de trigo	AMM	Meio**
Fe	0,57 ^d ± 0,07	9,98 ^a ± 0,38	7,27 ^b ± 0,25	2,41 ^c ± 0,14
Mn	0,09 ^d ± 0,01	10,16 ^a ± 0,29	0,42 ^c ± 0,04	2,07 ^b ± 0,01
Na	14,68 ^d ± 1,54	45,24 ^a ± 0,58	38,89 ^c ± 3,36	26,01 ^d ± 0,48
K	5,58 ^d ± 0,65	451,12 ^a ± 9,93	85,50 ^b ± 9,70	19,49 ^c ± 1,12
Cd	0,04 ^c ± 0,01	0,16 ^a ± 0,01	0,07 ^b ± 0,01	0,04 ^c ± 0,01
Cu	0,16 ^c ± 0,07	0,74 ^a ± 0,04	0,74 ^a ± 0,12	0,37 ^b ± 0,17
Al	6,01 ^c ± 2,22	14,05 ^a ± 0,39	7,78 ^b ± 0,06	1,89 ^d ± 0,18
Ca	783,62 ^b ± 13,03	1045,37 ^a ± 39,55	268,88 ^c ± 9,59	764,40 ^b ± 20,77
Cr	0,06 ^b ± 0,04	1,50 ^a ± 0,04	0,07 ^b ± 0,06	0,08 ^b ± 0,05
Mg	163,62 ^c ± 7,71	339,46 ^b ± 15,74	471,45 ^a ± 24,22	134,03 ^d ± 3,68
Zn	0,40 ^c ± 0,41	5,53 ^a ± 1,86	0,31 ^c ± 0,04	2,36 ^b ± 0,12
N ₂	1,60 ^c ± 0,10	25,60 ^a ± 0,30	30,50 ^a ± 0,40	8,40 ^b ± 0,70

*Médias ± desvio padrão seguidas de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa ao nível de 95% de confiança. **Meio de cultivo: 16 g de casca de laranja triturada, 2 g de farelo de trigo e 2 g de água de maceração de milho.

Conforme dados mostrados na Tabela 7, a casca de laranja apresentou 3,4 % *bu* – base úmida. (14 % *bs* – base seca) de pectina. O teor em substâncias pécticas varia de acordo com a origem botânica do produto vegetal. Entre os subprodutos de indústrias agrícolas e alimentares ricos em substâncias pécticas, bagaço de maçã, albedo cítrico e a polpa de beterraba açucareira apresentam teores superiores a 15 %_{bs} de pectina (PANCHEV *et al.*, 2010; CANTERI *et al.*, 2012). Farelo de trigo e água de maceração de milho apresentaram maiores teores de nitrogênio e minerais totais (Tabela 8), quando comparados com a casca de laranja. O meio de formulado apresentou teor de nitrogênio de 8,4 mg/g_{bu} (24 mg/g_{bs}).

O meio de bioprodução apresentou atividade de água (*A_w*) de 0,98 e umidade de 65,4 %, respectivamente. Esses parâmetros de processo apresentam efeitos significativos no crescimento dos micro-organismos, esporulação e produção de enzimas, como pode ser

constatado na literatura. Gervais e Molin (2003) avaliaram a produção das enzimas poligalacturonase e D-xylanase em diferentes valores de atividade de água (0,95-0,99) produzida por *Trichoderma viride* TS e a máxima produção ocorreu no valor de A_w de aproximadamente 0,98. Taragano e Pilosof (1999) avaliaram a influência do pH, tempo e atividade de água utilizando a ferramenta de planejamento experimental para produção das pectinases e observaram que utilizando um substrato com A_w de 0,93 favorece a produção das enzimas PME e PMGL e acima de 0,97, a produção de PG em fermentação em estado sólido (FES) por *A. niger* 148. Hamidi-Esfahani *et al.* (2004) analisaram o crescimento do fungo filamentoso *A. niger* em diferentes teores de umidade (40-65 %) e atividade de água (0,45-0,65) e observaram que estes dois parâmetros propicia no aumento do número de células viáveis presente no meio contendo farelo de trigo. Corona *et al.* (2005) investigaram o teor de água de água durante o cultivo de *Gibberella fujikuroi* em FES (farelo de trigo e amido solúvel) e verificaram que altos conteúdos de umidade e atividade de água (0,99) favorecem o processo de fermentação e a produção de metabólitos. Alcântara *et al.* (2010), no processo de fermentação semisólida (pedúnculo de caju, *A. niger* CCT 0916) destacam o valor da atividade de água como um fator importante, pois está diretamente relacionada com a quantidade de água disponível ao micro-organismo responsável pela síntese de pectinases, sendo que a máxima atividade pectinolítica foi obtida com A_w igual a 0,99.

Outro fator importante que influencia na produção das pectinases é o pH do meio de bioprodução, que neste estudo obteve como resposta 4,3, sendo esse favorável ao crescimento dos fungos filamentosos, conforme relatos de literatura (SANTOS, 2007; OLIVEIRA, 2013). Malvessi e Silveira (2004) estudaram a influência do pH (2 a 7) na produção da PG por *A. oryzae* CCT3940 e melhores resultados foram obtidos em pH entre 4 e 5, durante 96 h de fermentação submersa (FS). Fawole e Odunfa (2003) analisaram algumas variáveis que afetam a produção de enzimas pectinolíticas e constataram que a utilização de um meio de bioprodução com pH próximo ao valor de 5 favorece o crescimento do *A. niger* em FS e que valores abaixo e acima reduzem o crescimento do micro-organismo e o número de micélio, afetando assim, a produção enzimática.

Koser *et al.* (2014) avaliaram a atividade enzimática da PMGL utilizando diferentes resíduos agroindustriais (palha de trigo, bagaço de maçã, casca de limão, casca de laranja e papel), fontes de nitrogênio (extrato de levedura) e carbono (glicose), pH (2 - 7) e teores de umidade (50 - 75 %) e os resultados obtidos, desta investigação, demonstraram que as

condições de cultura têm grande influência sobre o potencial de produção de pectina liase por *A. oryzae*.

Além dos resíduos apresentarem diversificada quantidade de nutrientes e condições favoráveis para o crescimento e multiplicação dos micro-organismos (Tabela 7 e 8), os meios em estudo, apresentam, também, considerável quantidade de componentes minerais (Tabela 8), tais como, K, Ca e Mg. Gummadi *et al.* (2007) indica que a presença de sais com o Na, K e Li, favorecem a produção das enzimas pectina liase e pectato liase. Normalmente o substrato do meio de fermentação é suplementado com sais minerais como reportado por Camargo *et al.* (2005), Díaz *et al.* (2013) e Sandri *et al.* (2013).

4.2 ESTUDO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA BIOPRODUÇÃO DA EXO-PG

Estudos preliminares foram realizados para maximizar o processo de bioprodução de exo-PG. Para tanto, foi avaliada a influência da concentração de esporos, teor de umidade e pH em diferentes tempos de cultivo por *A. niger* ATCC 9642.

4.2.1 Concentração inicial de esporos

Avaliou-se a concentração de esporos viáveis de *A. niger* ATCC 9642 (5×10^4 a 5×10^7 esporos/g_{bu}) inoculados ao meio sólido de cultivo (24 a 96 h) e os resultados apresentam-se na Figura 4. A máxima atividade de exo-PG foi de 10,7 U/g_{bu} (30,6 U/g_{bs}) em 72 h de bioprodução e na concentração de 5×10^7 esporos/g_{bu} (65% de umidade). Esta atividade não diferiu significativamente ($p > 0,05$) da obtida ao empregar a concentração de 5×10^6 esporos/g_{bu} e desta forma, definiu-se esta concentração de esporos para os ensaios subsequentes deste estudo.

Estes resultados de produção de exo-PG corroboram os obtidos por Alcântara e Silva (2011) ao empregar pedúnculo de caju seco (50 % de umidade) e concentração de esporos de 10^6 esporos/g_{bu}. Gomes *et al.* (2010) e Zeni *et al.* (2011), em FS utilizando *A. niger* ATCC 9642 e *Penicillium brasilianum*, respectivamente, também utilizaram concentração de 5×10^6 esporos/mL.

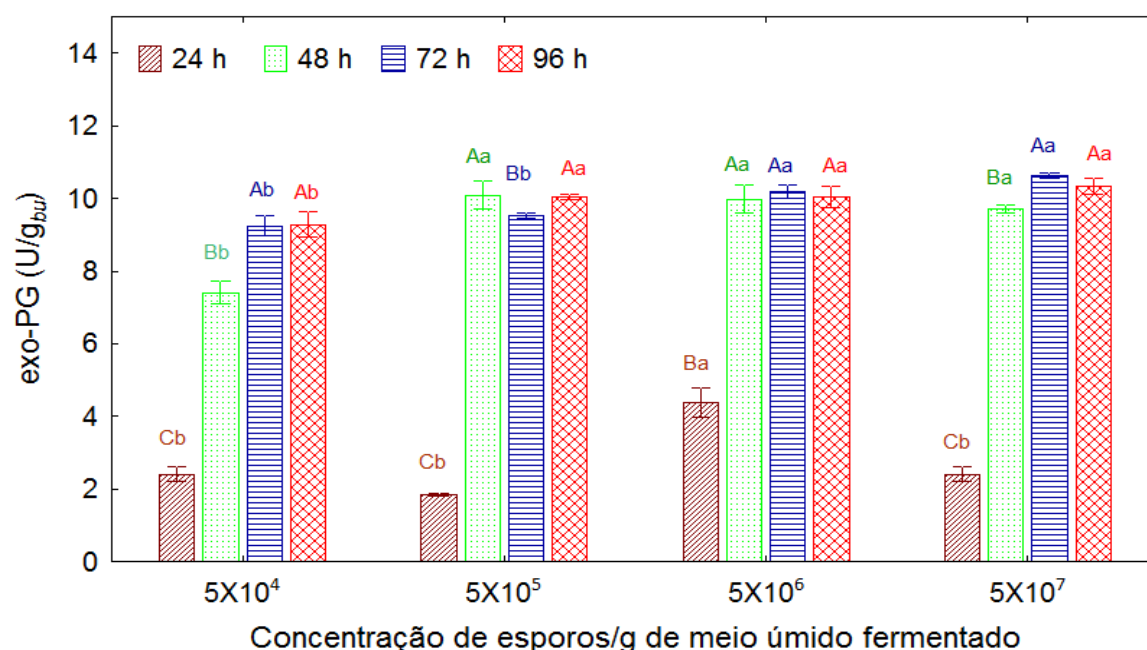


Figura 4: Atividade de exo-PG em função do tempo de fermentação (24 a 96 h) empregando diferentes concentrações de esporos (5×10^4 a 5×10^7 esporos/g_{bu}). Condições de cultivo: composição do meio (casca de laranja triturada, farelo de trigo e água de maceração de milho, 8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, pH_{inicial} 4,3, 30 °C. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m), 30 min, 20 °C, 175 rpm. Letras maiúsculas iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % entre diferentes hachuras, isto é, mesma concentração de esporos, letras minúsculas iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % entre hachuras iguais, isto é, mesmo tempo de fermentação (Teste de Tukey).

4.2.2 Teor inicial de umidade dos meios

O teor de umidade é um parâmetro significativo no crescimento dos micro-organismos e consequentemente na produção de enzimas, que catalisam substâncias complexas, gerando compostos de fácil assimilação. A água apresenta papel de destaque no CES em virtude do seu grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS e MOLIN, 2003).

Neste estudo, na mistura de bioprodução (umidade 18 %) contendo casca de laranja triturada e previamente dessecada, farelo de trigo e água de maceração de milho, foi adicionada água destilada para corrigir o teor de umidade para 30 % ($a_w = 0,830$), 40 % ($a_w = 0,861$), 50 % ($a_w = 0,888$), 60 % ($a_w = 0,936$) e 70% ($a_w = 0,985$). A casca de laranja não dessecada (*in natura*) apresentou o valor de umidade de 65% ($a_w = 0,965$).

A Figura 5 apresenta a atividade de exo-PG (U/g_{bu}) em função dos diferentes teores de umidade inicial do meio de cultivo (30, 40, 50, 60, 65 e 70 %) e do tempo de

fermentação (0 a 96 h). Observa-se que, ao utilizar a casca de laranja *in natura* (65 % de umidade), a máxima atividade de exo-PG foi de 10,3 U/g_{bu} (29,42 U/g_{bs}), após 48 h de bioprodução. Este resultado indica que não é necessária a operação de pré-dessecação do resíduo, reduzindo custos energéticos e tempo de bioprocessamento, definindo assim, a umidade, de 65 %, para os próximos ensaios.

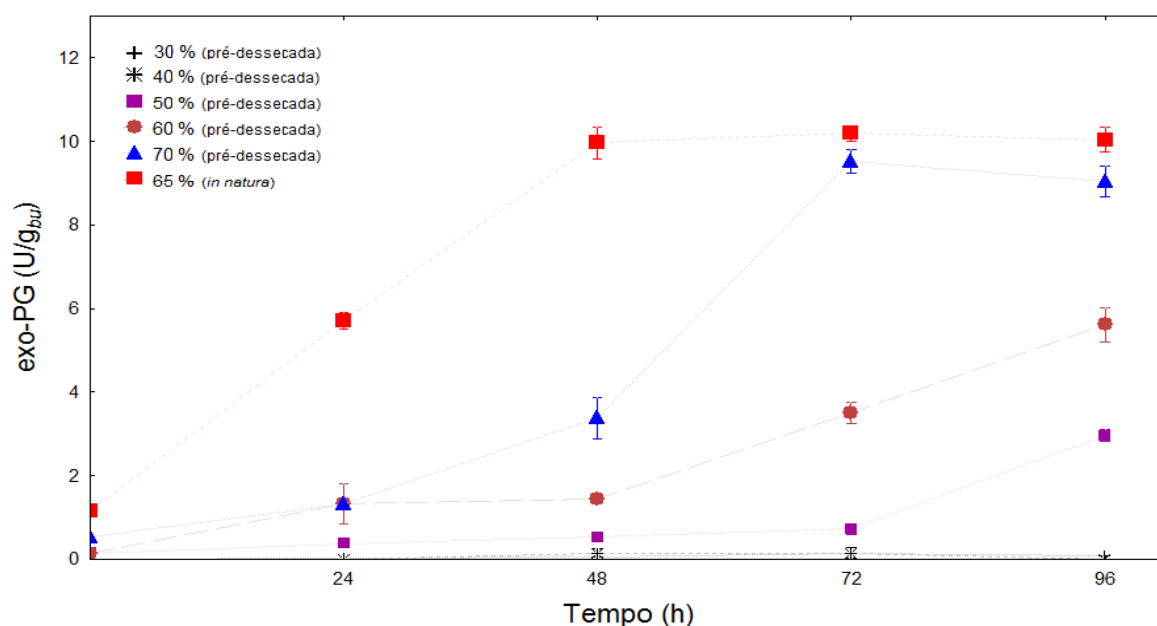


Figura 5: Atividade da exo-PG em diferentes teores de umidade (30 a 70 %) e tempos de fermentação (0 a 96 h), utilizando casca de laranja triturada *in natura* e pré-dessecada. Condições de cultivo: composição do meio (casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho, 8:1:1, m:m:m), 30°C, 5x10⁶ esporos/g_{bu}. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m), 30 min, 20 °C, 175 rpm.

Avaliando relatos de literatura, alguns autores estudaram a influência da umidade na atividade enzimática da PG. Alcântara *et al.* (2010) em CES (*A. niger* CCT 0916, pedúnculo de caju seco e moído, 80 h) atingiram maior atividade (11,0 U/g_{bu}) ao utilizar o meio com 50 % de umidade, suplementado com 0,5 % de sulfato de amônio e 71 h de fermentação. Souza *et al.* (2010) empregando casca e albedo de maracujá (40 % de umidade e 1 % de fonte de nitrogênio) encontraram um valor de 20,9 U/g_{bu} em 66 h de cultivo. Santos *et al.* (2008) observaram que a melhor condição de produção de exo-PG (10,1 U/g_{bu}) por *A. niger* CCT0916 foi na umidade de 40% (resíduo do pedúnculo de caju seco em FES) e suplementado com 1 % de sulfato de amônia, em 22 h de fermentação. Castilho *et al.* (2000), em cultivo de farelo de trigo, soja e *A. niger*, verificaram ótimos rendimentos de exo-PG (25,0 U/mL) com umidade de 40 % em 70 h de fermentação. Rodríguez Fernández (2009), utilizando polpa cítrica (50 a 65 % de umidade) por *A. niger*

F3, verificou que a atividade enzimática (238,5 U/g_{bs}) foi maior no meio com umidade inicial de 65 %. Blandino *et al.* (2002) investigaram o efeito do teor de umidade (50 a 60 %) na produção da poligalacturonase por *A. awamori* e constataram que o conteúdo de 60 % favorece o crescimento e a produção da enzima devido aos efeitos de difusão de oxigênio, conteúdo de água disponível e hidratação dos substratos.

4.2.3 Tempo de fermentação

A Figura 6 apresenta os resultados da influência do tempo de fermentação (24-240 h) na bioprodução da exo-PG em CES. Observa-se que a maior produção enzimática foi de 10,61 U/g_{bu} (30,1 U/g_{bs}) obtida em 216 h, porém não apresentando diferença significativa ao nível de 95% entre 48 a 240 h.

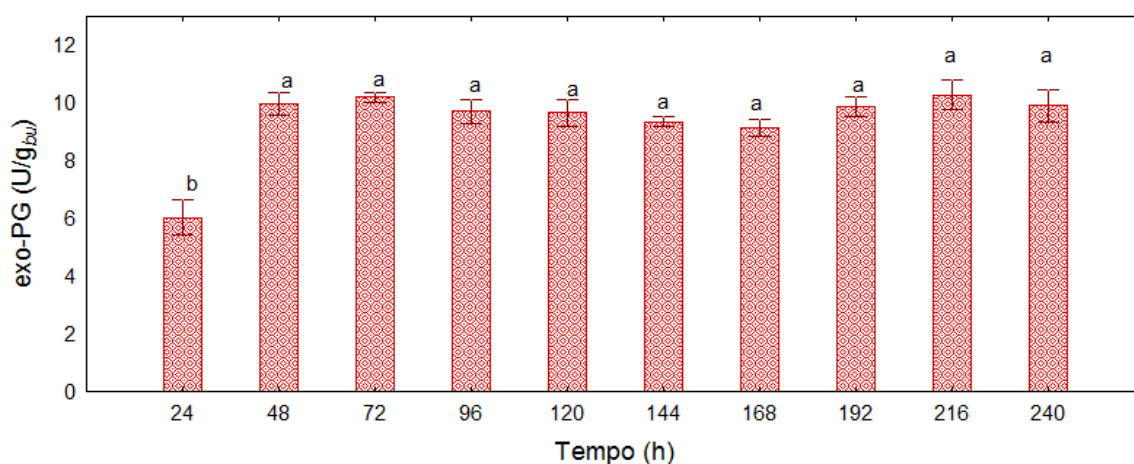


Figura 6: Atividade da exo-PG em diferentes tempos de fermentação (24 a 240 h). Condições de cultivo: casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m/m/m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g_{bu}. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m), 30 min, 20 °C, 175 rpm. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % (Teste de Tukey).

Na literatura encontram-se citados alguns trabalhos relacionando a produção de pectinases em CES em função dos substratos e tempo de fermentação. Díaz *et al.* (2012) estudaram a produção de exo-PG, por *A. awamori*, usando como substrato uva branca e/ou casca de laranja pré-dessecadas, atingiram atividade de aproximadamente 15,0 U/g_{bs} empregando como substrato apenas casca de laranja (70 % de umidade), após 96 h de fermentação. Heerd *et al.* (2012) em meio de cultivo farelo de trigo e casca de laranja, na proporção de 70:30 (m/m), a atividade máxima (19,5 U/g_{bs}) encontrada foi em 96 h de fermentação.

Os requisitos nutricionais e ambientais podem afetar o crescimento micelial e refletir diretamente na síntese das demais enzimas pectinolíticas (PME e PMGL). Para tanto, para os demais ensaios de otimização e/ou maximização da extração e bioprodução das pectinases, optou-se em realizar o processo de CES no tempo de 96 h, podendo obter assim, a total formação da massa filamentosa (micélio).

4.2.4 Efeito do pH

A Figura 7 apresenta os resultados da produção de exo-PG em diferentes pH (2,5 a 6,5) ajustando o meio com soluções tampão de 0,2 mol/L de citrato-ácido clorídrico (2,5-4,0) e fosfato-hidróxido de sódio (4,5-6,5). Observa-se que não houve diferença significativa, ao nível de 95%, na produção de exo-PG, obtendo-se aproximadamente 14,0 U/g_{bu} (40,0 U/g_{bs}) na faixa de pH de 4 a 6,5. No entanto, em pH abaixo de 4,0 verificou-se valores de atividade menores que 11,0 U/g_{bu} (31,4 U/g_{bs}). Portanto, para os demais ensaios, na bioprodução de pectinases, manteve-se o pH_{inicial} do meio de cultivo próximo a 4,5, ou seja, valores de pH obtidos da própria mistura dos substratos, sem ajustes com soluções tampões.

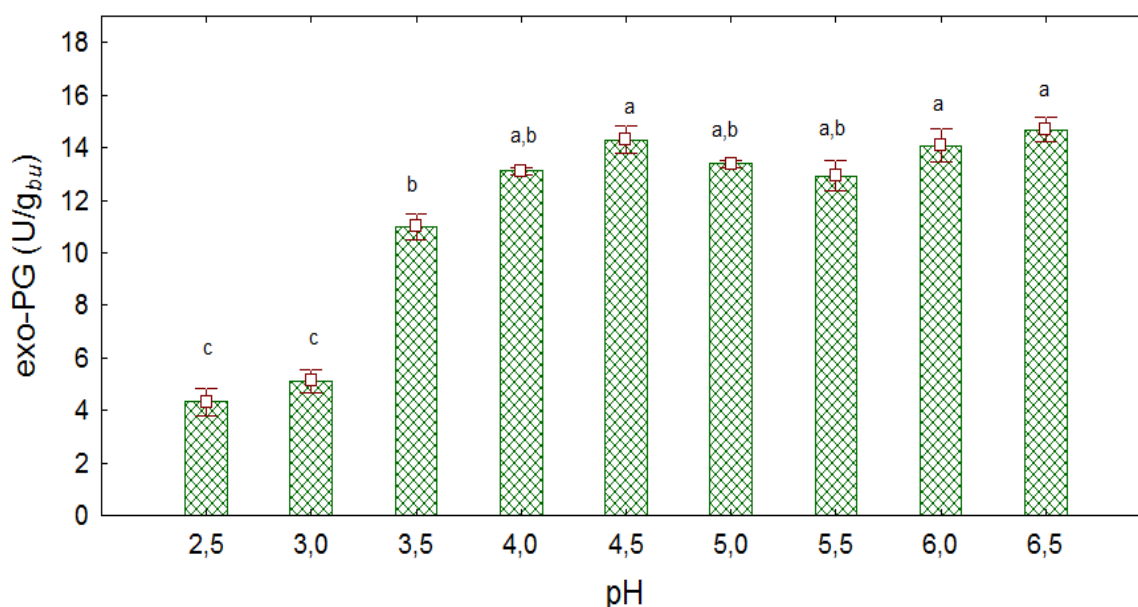


Figura 7: Produção de exo-PG em diferentes valores de pH (2,5 a 6,5). Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 96 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m), 30 min, 20 °C, 175 rpm. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % (Teste de Tukey).

Tari *et al.* (2008) relataram que a máxima produção de poligalacturonase geralmente encontra-se entre os valores de pH entre 3,5 e 5,5, dependendo da fonte microbiana. Valores de pH do meio nutriente menores que 4,5, o risco de contaminação por bactéria é reduzido (BUYUKKILECI *et al.*, 2011, TORTORA *et al.*, 2012).

4.3 EFEITOS DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA RECUPERAÇÃO DE PECTINASES

Neste item, analisaram-se as variáveis que podem interferir no processo de extração das enzimas presente no meio de cultivo, tais como, tipo de solvente, homogeneização e ciclos de extração.

4.3.1 Solvente de extração

A Tabela 9 apresenta os valores de atividade de exo-PG, PME e PMGL utilizando diferentes tipos de solventes e soluções extratoras (água destilada, 0,1 mol/L de NaCl, 0,005 mol/L de tampão citrato, pH 5,4; 0,1 mol/L de tampão acetato, pH 5,0; 0,1 %, v/v de Tween 80). O solvente NaCl (0,1 mol/L) foi eficiente no processo de extração de exo-PG, PME e PMGL, obtendo-se atividades de 10,18 U/g_{bu} (29,1 U/g_{bs}), 6,28 U/g_{bu} (17,9 U/g_{bs}), 43,31 U/g_{bu} (127, 7 U/g_{bs}), respectivamente. Ressalta-se que, a extração das enzimas PME e PMGL com NaCl não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) das extrações com os tampões acetato e citrato, respectivamente. Frente a isso, nos demais experimentos, foi utilizado NaCl (0,1 mol/L) como solvente para recuperação das enzimas exo-PG, PME e PMGL.

Tabela 9: Atividade enzimática das pectinases utilizando diferentes tipos de solventes e soluções no processo de extração da enzima hidrossolúvel.

Solvente	Atividade enzimática (U/g _{bu})		
	exo-PG	PME	PMGL
Água destilada	8,06 ± 0,53 ^{c,b}	3,22 ± 0,42 ^b	38,86 ± 1,81 ^b
NaCl	10,18 ± 0,15 ^a	6,28 ± 0,42 ^a	43,31 ± 0,93 ^a
Tampão citrato	8,84 ± 0,26 ^b	4,17 ± 0,76 ^b	44,14 ± 1,88 ^a
Tampão acetato	7,49 ± 0,60 ^c	7,42 ± 0,58 ^a	40,00 ± 0,64 ^a
Tween 80	7,73 ± 0,22 ^c	3,72 ± 0,63 ^b	34,47 ± 0,88 ^b

Solventes (água destilada, NaCl 0,1 mol/L) e soluções extratoras (tampão citrato 0,005 mol/L, pH 5,4; tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0 e Tween 80, 0,1 %, v/v). Condições de extração: 30 min, 20 °C, 175 rpm, 5:1 (v:m). Condições de fermentação: Composição do meio (casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho, 8:1:1 (m:m:m), 65 % de umidade, pH_{inicial} 4,3), 30°C, 5x10⁶ esporos/g_{bu}, 96 h. Letras iguais entre linhas indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (Teste de Tukey).

Alguns trabalhos relatam a recuperação de enzimas empregando diferentes solventes na extração. Díaz *et al.* (2007) avaliaram o processo de extração de exo-PG empregando os mesmos solventes do presente estudo e obtiveram, também, a maior recuperação da enzima (42,5 U/g_{bs}) com NaCl (0,1 mol/L). Fadel (2001) aplicou água, cloreto de sódio e tampão citrato, fostato e acetato no processo de extração da enzima xilanase, sendo que ao utilizar a solução de 0,3 mol/L de NaCl a atividade foi incrementada em aproximadamente 25 % quando comparado com a água destilada e em 16 % em relação aos tampões citrato e acetato.

Castilho *et al.* (2000) avaliaram o tempo de extração (10, 30 e 50 min), tipos de solventes (água destilada, tampão acetato pH 4,4 e glicerol 50 %) e temperatura de extração (20 a 50°C) e observaram que o tratamento com tampão acetato, por 30 min, a 35°C foi a melhor condição de extração da poligalacturona produzida por *A. niger* inoculado em farelo de trigo e soja. Singh *et al.* (1999) investigaram a extração enzimática da poligalacturonase (bioproduzida por *A. carbonarius* no substrato farelo de trigo) empregando água e tampão acetato, isolados ou com adição de diferentes sais, obtendo como melhor resposta ao utilizarem uma solução de água e Na₂SO₄ (0,1 mol/L).

A avaliação das condições de extração das enzimas produzidas em CES e o tipo de solvente utilizado é de fundamental importância para otimizar o processo, maximizar a produção e favorecer etapas subsequentes, como, concentração e purificação enzimática.

As proteínas interagem com o solvente através de átomos que participam de ligações peptídicas e dependem do pH, força iônica e temperatura. Possivelmente, a substância iônica NaCl na concentração de 0,1 mol/L, diluída em água apresentou interações com a proteína aumentando sua solvatação e consequentemente sua solubilização, devido as forças intermoleculares que ocorre no processo de extração.

4.3.2 Otimização do processo de recuperação de pectinases

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2³ (valores reais e codificados) para a recuperação das enzimas e as respostas em atividade de exo-PG, PME e PMGL, utilizando NaCl (0,1 mol/L) no processo de extração.

Os resultados foram tratados estatisticamente e as Tabelas 17 e 18 (Apêndice A) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, *t*(2) e a análise de

variância – ANOVA do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , para a recuperação da exo-PG.

Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) da recuperação enzimática e as respostas em atividade de exo-PG, PME e PMGL (U/g_{bu}).

Ensaio	Variáveis independentes*			Atividade enzimática (U/g _{bu})		
	X ₁	X ₂	X ₃	exo-PG	PME	PMGL
1	-1 (20)	-1 (15)	-1 (80)	8,02	4,83	43,88
2	1 (40)	-1 (15)	-1 (80)	7,91	6,50	39,14
3	-1 (20)	1 (45)	-1 (80)	8,75	5,17	40,12
4	1 (40)	1 (45)	-1 (80)	7,00	6,50	38,48
5	-1 (20)	-1 (15)	1 (280)	8,68	5,17	46,63
6	1 (40)	-1 (15)	1 (280)	9,84	4,83	43,32
7	-1 (20)	1 (45)	1 (280)	8,86	5,00	37,85
8	1 (40)	1 (45)	1 (280)	8,68	6,33	41,11
9	-1,68 (13,2)	0 (30)	0 (180)	7,49	5,17	27,36
10	1,68 (46,8)	0 (30)	0 (180)	6,79	6,00	24,65
11	0 (30)	-1,68 (4,8)	0 (180)	7,70	5,58	45,56
12	0 (30)	1,68 (55,2)	0 (180)	9,31	6,83	50,41
13	0 (30)	0 (30)	-1,68 (12)	8,37	5,83	35,96
14	0 (30)	0 (30)	1,68 (348)	8,58	6,67	46,96
15	0 (30)	0 (30)	0 (180)	9,42	6,17	42,73
16	0 (30)	0 (30)	0 (180)	9,94	6,50	41,11
17	0 (30)	0 (30)	0 (180)	9,63	6,33	41,52

*X₁= Temperatura (°C), X₂= Tempo (min), X₃= Frequência de agitação (rpm). Variável independente fixa: solvente de extração NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m). Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5x10⁶ esporos/g_{bu}, 96 h.

A Equação 7 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da exo-PG em função das variáveis analisadas (temperatura e frequência de agitação), dentro da faixa estudada. Observa-se que a variável temperatura apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) negativo e a variável agitação, efeito positivo ($p < 0,05$). No entanto, o tempo e as interações entre as variáveis estudadas não exerceram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a resposta. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA. O modelo foi validado pela análise de variância, onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,88 e $F_{calculado}$ de 1,8 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 8.

Equação 7:

$$\text{Exo-PG} = 9,62 - 0,773 (X_1)^2 + 0,350 (X_3) \quad (7)$$

Onde: Exo-PG = Atividade de exo-poligalacturonase (U/g_{bu});

X₁ = Temperatura (°C);

X₃ = Frequência de agitação (rpm).

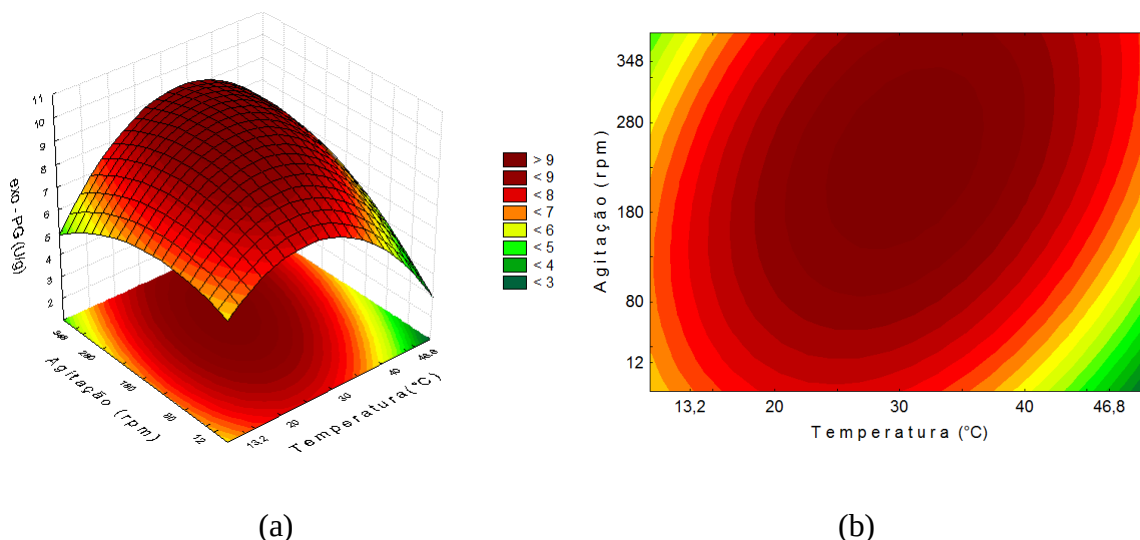


Figura 8: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para a recuperação da exo-PG (U/g_{bu}) em função da agitação e temperatura. Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m/m/m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m).

De acordo com a Figura 8, verifica-se que há uma região de máxima de recuperação da exo-PG e que se encontra próxima ao ponto central de temperatura (25-35°C) e frequência de agitação (180-300 rpm), os quais caracterizam a otimização da recuperação da exo-PG com o solvente de extração, NaCl (0,1 mol/L). Importante destacar que a faixa de temperatura de 25 a 35°C é considerada interessante na prática industrial, pois praticamente corresponde a temperatura ambiente, não necessitando gastos energéticos adicionais na etapa de extração.

Em relação à extração de PME (Tabela 10), verifica-se que a máxima recuperação foi de 6,83 U/g_{bu} (19,5 U/g_{bs}), a 30 °C, 55,2 min e 180 rpm (ensaio 12) e a mínima atividade foi de 4,83 U/g_{bu} (13,8 U/g_{bs}) nos ensaios 1 e 6, o que representa um acréscimo de 41 % sobre o valor da atividade quando comparada ao ensaio 12.

Os resultados foram tratados estatisticamente e as Tabelas 19 e 20 (Apêndice A) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p , $t(2)$ e a análise de variância – ANOVA do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , para a recuperação da PME. A Equação 8 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade da PME em função das variáveis analisadas (temperatura e tempo de contato), dentro da faixa estudada. Verifica-se que a variável temperatura e tempo linear exerceram efeito significativo ($p < 0,05$) positivo sobre a recuperação da PME. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 20, Apêndice A), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,84 e $F_{calculado}$ de 1,65 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 9.

Equação 8:

$$PME = 6,36 + 0,396(X_1) - 0,367(X_1)^2 + 0,276(X_2) \quad (8)$$

Onde: PME = Atividade de pectina metilesterase (U/g_{bu});

X_1 = Temperatura ($^{\circ}C$);

X_2 = Tempo (min).

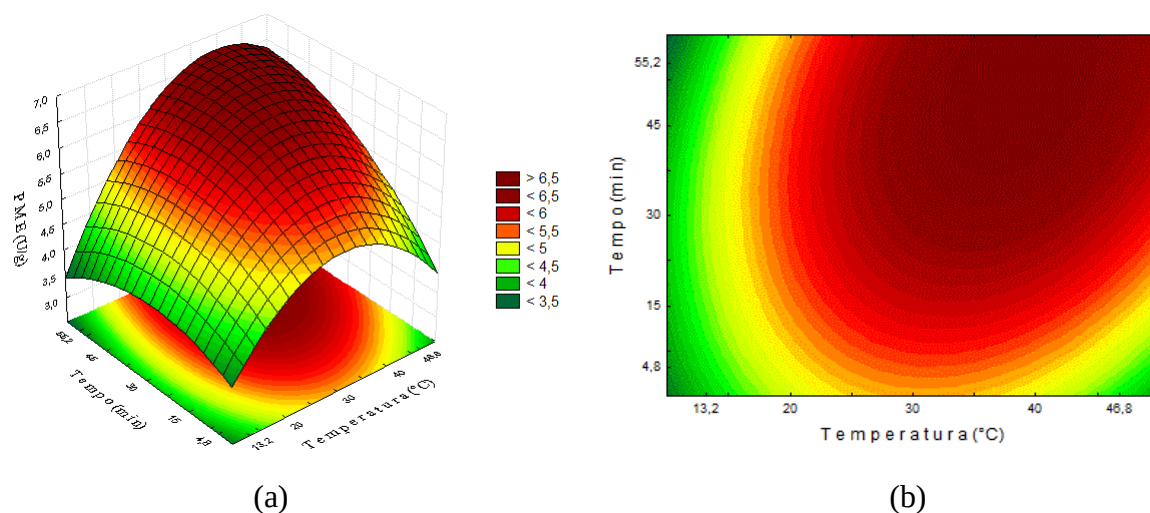


Figura 9: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para a recuperação da PME (U/g_{bu}) em função do tempo e temperatura. Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, $30^{\circ}C$, 5×10^6 esporos/ g_{bu} , 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m).

Pode-se observar que através da análise da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 9) há uma região ótima para obter o maior valor da atividade enzimática da PME, podendo assim, serem utilizadas, em processos operacionais, as combinações das variáveis de extração: temperatura (32 - 45°C) e tempo (35 - 60 min), os quais caracterizam a otimização da extração com o solvente NaCl (0,1 mol/L). Em face disso, para os próximos ensaios foi estabelecido as condições de temperatura de 30°C, 55 min e 180 rpm, para o processo de extração da enzima PME.

Já, na análise da enzima PMGL, de acordo com a Tabela 10, verifica-se que a máxima atividade recuperada foi de 50,41 U/g_{bu} (144 U/g_{bs}) ao utilizar 30 °C, 55,2 min e 180 rpm (ensaio 12), e a mínima atividade foi 24,41 U/g_{bu} (69,7 U/g_{bs}) ao utilizar 46,8 °C, 30 min e 180 rpm (ensaio 10), portanto, ao aumentar a temperatura de processo diminui a quantidade de enzima extraída, bem como, o tempo influencia positivamente no processo de extração (p<0,05).

Os resultados foram tratados estatisticamente e as Tabelas 21 e 22 (Apêndice A) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, *t*(2) e a análise de variância – ANOVA do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³, para a recuperação da PMGL. A Equação 9 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da PMGL em função das variáveis avaliadas (temperatura, frequência de agitação e tempo de contato), dentro da faixa estudada. As variáveis, tempo quadrático e agitação linear, apresentaram efeito significativo (p<0,05) positivo e a variável temperatura quadrática exerceu efeito negativo (p<0,05) sobre a recuperação de PMGL. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 22, Apêndice A), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,90 e *F*_{calculado} de 5,62 vezes maior que *F*_{tabelado}, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 10.

Equação 9:

$$PMGL = 41,58 - 4,91 (X_1)^2 + 2,87 (X_2)^2 + 1,89(X_3) \quad (9)$$

Onde: PMGL = Atividade de pectina liase (U/g_{bu});

*X*₁ = Temperatura (°C);

*X*₂ = Tempo (min);

*X*₃ = Frequência de agitação (rpm).

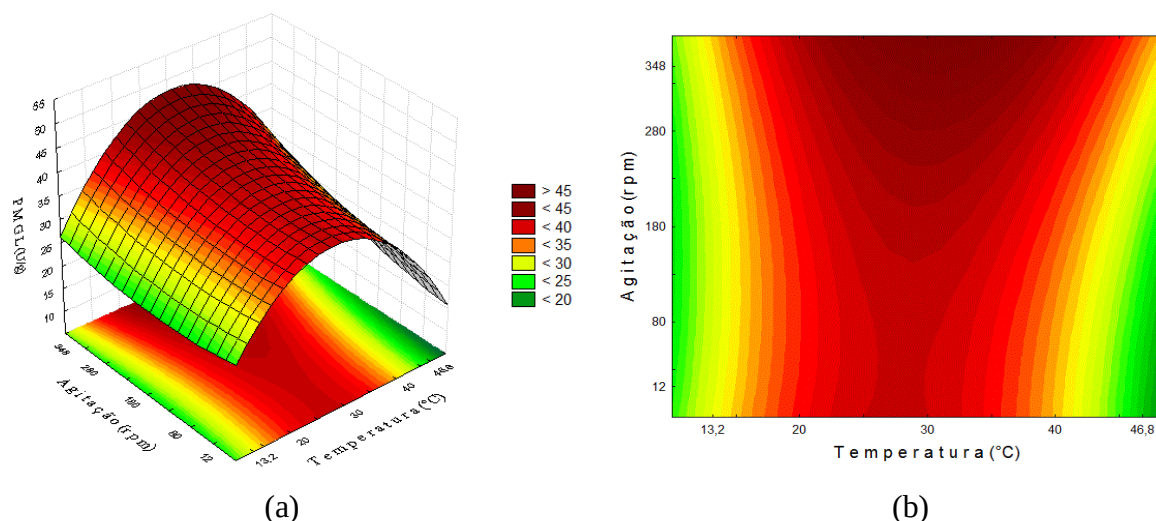


Figura 10: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da PMGL (U/g_{bu}) em função da agitação e temperatura. Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/ g_{bu} , 96 h. Solvente de extração: NaCl 0,1 mol/L, relação solvente:substrato 5:1 (v:m).

Pode-se observar através da análise da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 10), que há uma região ótima para obter a máxima recuperação da PMGL, próxima a 30°C, 55 min e na frequência de agitação superior a 280 rpm.

Na literatura alguns estudos avaliaram diferentes parâmetros para a recuperação de enzimas pectinolíticas. Sousa *et al.* (2012) no estudo da otimização da extração de poligalacturonase (fermentação semi-sólida, resíduo agroindustrial do maracujá-amarelo, *A. niger* mutante CCT 0916) determinaram a frequência de agitação, tempo de contato e relação solvente (tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5)/substrato, sendo que a relação solvente/substrato (10:1) promoveu aumento na atividade enzimática (48,9 U/g_{bu}) e proporcionaram a melhor recuperação da enzima. Santos *et al.* (2008) constataram que o sistema com agitação (200 rpm) em tempo de contato de 100 min e razão 5:1 (v:m) solvente:meio fermentado foi a melhor condição avaliada no processo de extração da enzima bioproduzida em FES (16,1 U/g_{bu} , pedúnculo de caju lavado, 40 % de umidade, 16 h por *A. niger* CCT0916).

Hendges (2006), utilizando resíduo de farelo de trigo e o agente biológico *A. niger*, obtiveram a máxima recuperação de poligalacturonase (100 U/g_{bs}) no tempo de contato de 15 min a 30°C, com água (pH 4). Castilho *et al.* (1999) verificaram que 30 min a 25 °C foram as condições adequadas para a extração da PG produzida por *A. niger* em FES, dentro da faixa estudada. Castilho *et al.* (2000) em FES (farelo de trigo e soja, 40 % de

umidade, 22 h, *A. niger*) compararam as condições de tempo de extração (10, 30 e 50 min), tipos de solventes (água destilada, tampão acetato pH 4,4 e glicerol 50 %) e temperatura de incubação (25 a 45 °C) no processo de extração e os melhores resultados foram em 30 min, 35 °C e tampão acetato (pH 4,4).

Singh *et al.* (1999) investigaram os parâmetros que influenciam no processo de extração enzimática poligalacturonase produzida por *A. carbonarius* em FES (farelo de trigo, 60 % de umidade, 77 h de fermentação a 30 °C) incluindo temperatura (4 a 40°C), tempo de extração (5 a 120 min), razão solvente:substrato, condições de extração (estático e 220 rpm) e tipos de solventes (água destilada e tampão acetato pH 4,3). Os autores verificaram que após 15 min de contato entre o solvente (água destilada) e a massa fermentativa a atividade permaneceu constante (tempos prolongados promovem a extração de outras proteínas e pigmentos). Temperaturas entre 28 e 30 °C foram as melhores condições avaliadas, pois temperaturas acima e abaixo deste valor resultaram em um decréscimo de aproximadamente 60 % no valor da atividade enzimática e a agitação não aumentou significativamente a atividade.

A eficiência da solubilidade das proteínas presentes nas enzimas pectinolíticas obtidas do processo de extração sólido-líquido, possivelmente é influenciada pela interação entre diferentes fatores: grau de hidratação, densidade e distribuição de cargas das moléculas, temperatura, métodos de ruptura celular e lavagem do tecido. Em geral, analisando o comportamento do processo de extração das enzimas pectinolíticas (exo-PG, PME e PMGL), o aumento excessivo da variável temperatura apresentou efeito negativo no processo de extração da enzima.

No caso dos produtos naturais (essências e fármacos) e biológicos (proteínas e enzimas), o incremento, excessivo da temperatura, afeta a qualidade dos produtos extraídos (RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, 2009). É possível que altas temperaturas influenciem nos componentes do meio fermentado, causando efeito de gelatinização e/ou desnaturação dos carboidratos e proteínas, respectivamente, dificultando assim, o processo de extração da enzima hidrossolúvel. Além disso, em períodos muito prolongados de agitação poderia ocorrer um aumento da extração de agentes desnaturantes, diminuindo assim o rendimento da extração. Portanto, fica evidente que a escolha dos parâmetros de processo e métodos de recuperação deve ser previamente definida para se obter o máximo de rendimento do biocomposto desejado e menor exposição de agentes impróprios.

4.3.3 Avaliação do ciclo de extração

A Figura 11 apresenta as atividades das enzimas pectinolíticas em relação a dez ciclos de extração produzidas por *A. niger* ATCC 9642 em CES. É importante ressaltar que para ambos os tratamentos, o primeiro ciclo de extração foi conduzido da mesma maneira, obtendo uma atividade enzimática de aproximadamente 9 U/g_{bu} (25,7 U/g_{bs}, Figura 11a), 6 U/g_{bu} (17,14 U/g_{bs}, Figura 11b) e 47 U/g_{bu} (134,3 U/g_{bs}, Figura 11c) para exo-PG, PME e PMGL, respectivamente. O rendimento diminui significativamente ($p < 0,05$) após o segundo ciclo para as pectinases estudadas e mantém praticamente constante a partir deste ciclo.

Trabalhos semelhantes foram realizados por Castilho *et al.* (1999), Fadel (2001) e Díaz *et al.* (2007). Os primeiros autores avaliaram a evolução da atividade de pectinases produzidas pelo *A. niger* nos extratos oriundos de lavagens sucessivas e notaram que a atividade enzimática diminui significativamente a cada nova extração, fornecendo, nas últimas passagens de solvente, extratos muito diluídos e uma atividade próxima de zero.

Fadel (2001) avaliou o efeito da extração do extrato bruto de xilanase após sucessivas centrifugações e obteve uma eficiência de 77 % após a sexta extração. Díaz *et al.* (2007) verificaram a eficiência da extração de casca de uva fermentada utilizando como solvente água destilada após seis ciclos e o resultado indicou que após o sexto estágio de extração mais enzimas poderiam ser separadas do sólido fermentado.

Singh *et al.* (1999) determinaram os parâmetros de recuperação da pectinase (*A. carbonarius*) e constataram que após o terceiro ciclo aumentou de 10,0 para 42,0 U/mL no fim da terceira extração sequencial. RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ *et al.* (2012) em seu estudo sobre a extração sucessiva (6 ciclos) da enzima PG (FES, *A. niger* F3, 96h de fermentação) observaram que em três ciclos de extração foi possível recuperar 70% de toda enzima PG recuperada, sendo portanto muito próximo ao valor encontrado neste estudo, que foi de 57% e, além disso, repararam que aplicações de duas etapas de extração equivalem a duas fermentações.

Baseado nos resultados obtidos (Figura 11), para os próximos experimentos definiu-se a extração com NaCl (0,1 mol/L) nas condições de 30°C, 30 min, 180 rpm para exo-PG e 30°C, 55 min, 180 rpm para a PME e PMGL, respectivamente e a realização de 3 ciclos de extração (relação solvente:meio cultivado 10:1, v:m) obtendo o valor de atividade de 13,1 U/g_{bu} (37,4 U/g_{bs}), 6,83 U/g_{bu} (19,5 U/g_{bs}), 59,5 U/g_{bu} (169,1 U/g_{bs}), para exo-PG, PME e PMGL, respectivamente.

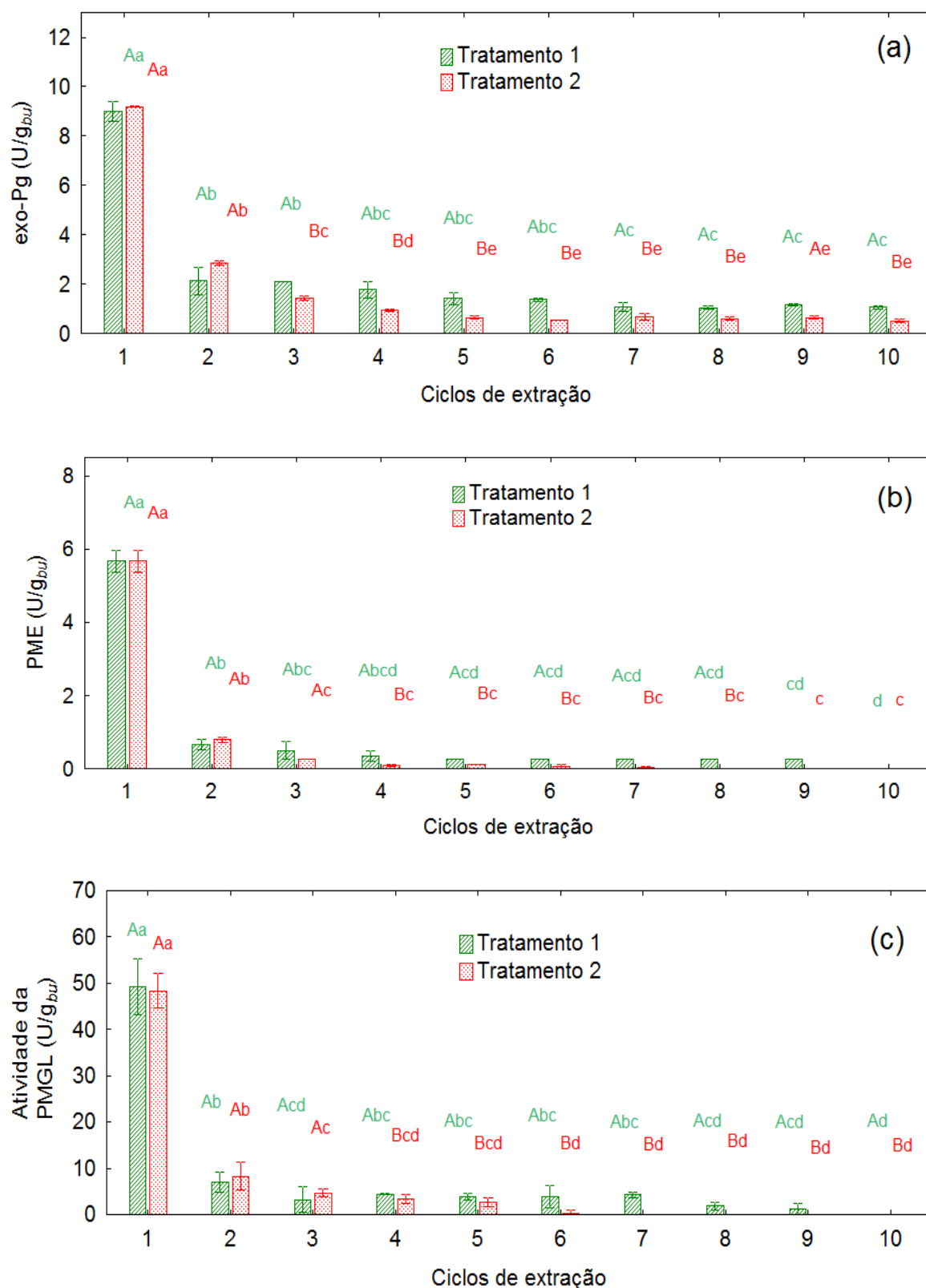


Figura 11: Evolução da atividade enzimática de exo-PG (a), PME (b) e PMGL (c) após sucessivas extrações do meio fermentado, sem homogeneização (estático, tratamento 1) e homogeneizado a cada ciclo (tratamento 2). Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Letras iguais maiúsculas/minúsculas indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos/ciclos (Teste de Tukey).

4.4 MAXIMIZAÇÃO E/OU OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE PECTINASES

A partir dos resultados obtidos nos ensaios preliminares (itens 4.2 e 4.3) foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 (Delineamento Composto Central Rotacional, DCCR) para a otimização do processo de bioprodução das pectinases. A Tabela 11 apresenta a matriz do DCCR (valores reais e codificados) com as variáveis independentes (concentração de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho) e respostas em atividades das pectinases (exo-PG, PME e PMGL).

Tabela 11: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores codificados e reais) e as respostas em atividade de exo-PG, PME e PMGL, obtidos no processo de produção enzimática utilizando diferentes concentrações de substratos.

Ensaio	Variáveis independentes*			Atividade enzimática (U/g _{bu})		
	X ₁	X ₂	X ₃	Exo-PG	PME	PMGL
1	-1 (12)	-1 (0,81)	-1 (1)	13,91	8,67	40,82
2	1 (20)	-1 (0,81)	-1 (1)	13,04	4,67	31,99
3	-1 (12)	1 (3,19)	-1 (1)	14,20	6,00	31,31
4	1 (20)	1 (3,19)	-1 (1)	12,57	5,67	18,26
5	-1 (12)	-1 (0,81)	1 (3)	14,80	11,00	67,60
6	1 (20)	-1 (0,81)	1 (3)	14,21	4,67	48,10
7	-1 (12)	1 (3,19)	1 (3)	14,05	6,67	45,37
8	1 (20)	1 (3,19)	1 (3)	15,11	5,33	42,82
9	-1,68 (9,28)	0 (2)	0 (2)	13,49	10,33	58,80
10	1,68 (22,72)	0 (2)	0 (2)	12,44	4,67	50,04
11	0 (16)	-1,68 (0)	0 (2)	13,30	7,67	78,50
12	0 (16)	1,68 (4)	0 (2)	15,23	7,00	59,95
13	0 (16)	0 (2)	-1,68 (0,32)	14,78	7,33	34,58
14	0 (16)	0 (2)	1,68 (3,68)	15,47	7,67	76,90
15	0 (16)	0 (2)	0 (2)	12,96	8,00	55,50
16	0 (16)	0 (2)	0 (2)	13,01	7,67	55,82
17	0 (16)	0 (2)	0 (2)	12,90	8,33	56,89

*X₁= Casca de laranja (g), X₂= Farelo de trigo (g), X₃= Água de maceração de milho (g). Variáveis independentes fixas: 5×10^6 esporos/g_{bu}, 65 % umidade, 30°C por 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m). Condições de extração: 30 °C, 30 min, 180 rpm (exo-PG) e 30 °C, 55 min, 180 rpm (PME e PMGL)

4.4.1 Exo-Poligalaturonase - PG

A máxima atividade de exo-PG foi de 15,47 U/g_{bu} (44,2 U/g_{bs}) com meio a base de 74,1 % de casca de laranja, 9,3 % de farelo de trigo e 16,6 % de água de maceração de

milho (ensaio 14, Tabela 11), nas condições de 65 % de umidade, 30°C, 96 h de bioprodução, pH_{inicial} de 4,3 e concentração de esporos de 5×10^6 esporos/g_{bu}.

Os resultados foram tratados estatisticamente e a Figura 12 apresenta o Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas. Verifica-se que a água de maceração de milho e o farelo de trigo apresentam efeito significativo ($p < 0,05$) positivo, demonstrando que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para o +1 possivelmente ocasionará um incremento na atividade da exo-PG. A variável casca de laranja apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) negativo, ou seja, se concentração desta variável diminuir, possivelmente ocasionará um incremento da atividade, no entanto, apresentou-se efeito positivo ($p < 0,05$) na interação com farelo de trigo e água de maceração de milho.

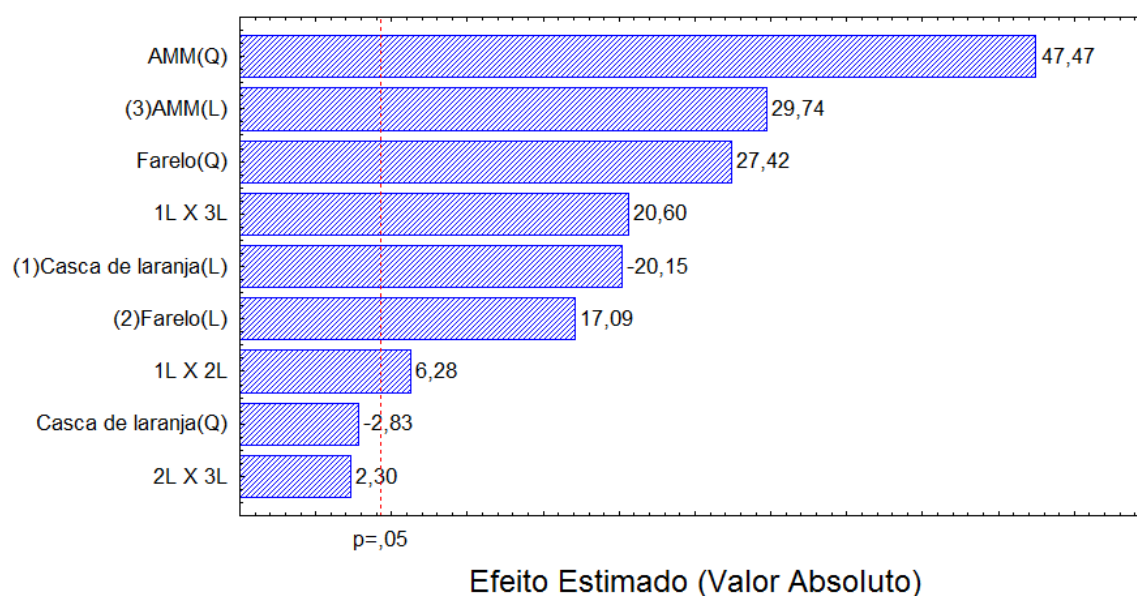


Figura 12: Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2^3 no valor da atividade enzimática (exo-PG). Condições de bioprodução: 5×10^6 esporos/g_{bu}, 65 % umidade, 30°C por 96 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 30 °C, 30 min, 180 rpm.

Portanto, considerando que a casca de laranja é um importante indutor para a formação de pectinases (NIGHOJKAR *et al.*, 2006), que a concentração de casca poderia influenciar na compactação do meio e transferência de massa devido a porosidade entre as partículas e que existe interação entre a variável X_1 (casca de laranja) e das demais variáveis em estudo (Figura 12), manteve-se constante a quantidade de casca de laranja (9 g). A partir destas constatações, a faixa da variável farelo de trigo e água de maceração

de milho foram deslocadas e um novo planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em atividade da exo-PG em função da concentração de farelo de trigo e água de maceração.

Ensaio	*Variáveis independentes		Exo-PG (U/g _{bu})
	X ₂	X ₃	
1	-1 (1,16)	-1 (4,66)	16,96
2	-1 (1,16)	1 (9,34)	10,64
3	1 (6,48)	-1 (4,66)	18,61
4	1 (6,48)	1 (9,34)	17,54
5	0 (4)	-1,41 (3,7)	16,70
6	0 (4)	1,41 (10,3)	8,41
7	-1,41 (0)	0 (7)	13,10
8	1,41 (7,5)	0 (7)	18,03
9	0 (4)	0 (7)	20,29
10	0 (4)	0 (7)	19,84
11	0 (4)	0 (7)	20,19

*X₂= Farelo de trigo (g), X₃= Água de maceração de milho (g). Variáveis independentes fixas: casca de laranja (9 g), 5×10^6 esporos/g_{bu}, 65 % umidade, 30°C por 96 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 30 °C, 30 min, 180 rpm.

De acordo com a Tabela 12, a máxima atividade da enzima exo-PG foi de 20,29 U/g_{bu} (58,0 U/g_{bs}) em meio composto por 9,0 g de casca de laranja, 4,0 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho (ensaio 9, 10, 11).

Os resultados foram tratados estatisticamente e as Tabelas 23 e 24 (Apêndice B) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, $t(2)$ e a análise de variância – ANOVA do planejamento fatorial completo 2^2 , para a atividade de exo-PG.

A Equação 10 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da exo-PG em função das variáveis (farelo de trigo e AMM) que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 24, Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,97 e $F_{calculado}$ de 2,92 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno, apresentadas na Figura 13.

Equação 10:

$$\text{Exo-PG} = 20,01 + 1,94 (X_2) - 1,80 (X_2)^2 - 2,39 (X_3) - 3,31 (X_3)^2 + 1,31 (X_2 \cdot X_3) \quad (10)$$

Onde: Exo-PG = Atividade da enzima exo-poligalacturonase (U/g_{bu});

X₂ = Quantidade de farelo de trigo (g);

X₃ = Quantidade de água de maceração de milho (g).

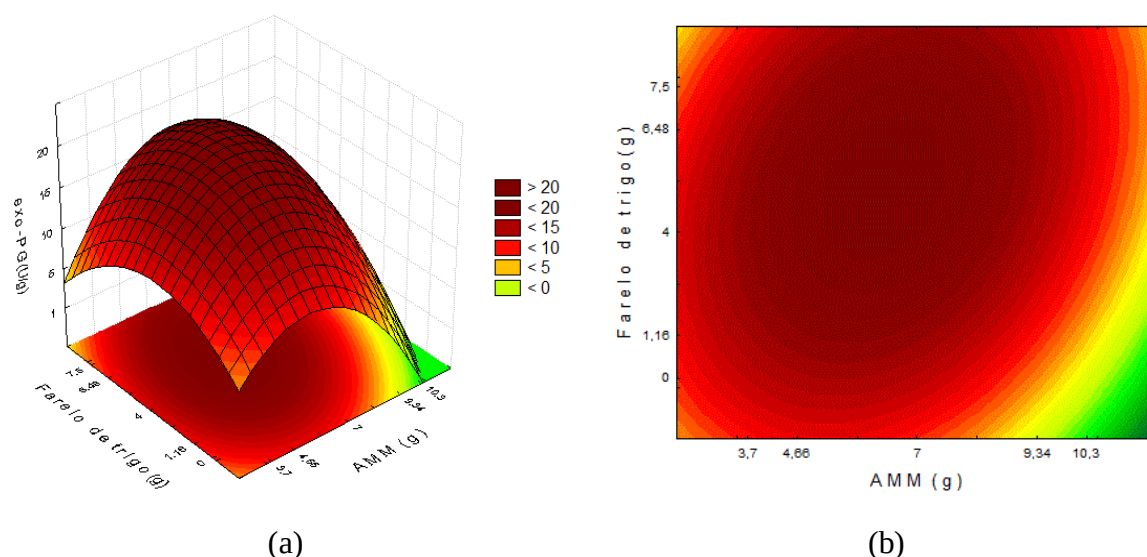


Figura 13: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da exo-PG (U/g_{bu}) em função da concentração de farelo de trigo (g) e água de maceração de milho (g). Condições de bioprodução: 5×10^6 esporos/g_{bu}, 65 % umidade, 30°C, 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Relação solvente:substrato: 10:1 (v:m). Condições de extração: 30 °C, 30 min, 180 rpm.

De acordo com a Figura 13 verifica-se que a máxima produção de exo-PG foi de 20,3 U/g_{bu} (58,0 U/g_{bs}) e encontra-se em uma ampla faixa de concentração de farelo de trigo e AMM de 4 a 6,5 g e 5 a 7,5 g, respectivamente, fixando em 9 g de casca de laranja, caracterizando, desta forma a otimização da produção de exo-PG em CES.

Heerd *et al.* (2012) utilizando uma mistura de casca de laranja:farelo de trigo (70:30 m/m) na bioprodução de enzimas pectinolíticas sinalizou que o uso deste meio complexo, em FES, apresenta um grande potencial para a produção de pectinases por micro-organismos do gênero *Aspergillus*, obtendo-se atividade de 14 a 28 U/g_{bs}, dependendo da cepa.

4.4.2 Pectina metilesterase – PME

As máximas atividades enzimáticas de PME (Tabela 11) foram de 11,0 U/g_{bu} (31,4 U/g_{bs}) e 10,33 U/g_{bu} (29,4 U/g_{bs}), obtidas nos ensaios 5 (75,9 % de casca de laranja, 5,1 % de farelo de trigo e 20 % de água de maceração de milho) e 9 (70 % de casca de laranja, 15 % de farelo de trigo e 15 % de água de maceração de milho), respectivamente.

A Tabela 25 (Apêndice B) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da PME ao nível de confiança de 95 %.

A Equação 11 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve a atividade de PME em função das variáveis: casca de laranja, farelo de trigo e AMM, dentro da faixa estudada. Verifica-se que a variável casca de laranja e farelo de trigo, isoladamente, teve efeito (p<0,05) negativo na atividade da pectina metilesterase, porém a interação entre estes dois substratos apresentou efeito significativo (p<0,05) positivo.

O modelo (Equação 11) foi validado pela análise de variância (Tabela 26, Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,91 e $F_{calculado}$ de 6,26 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 14. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA).

Equação 11:

$$PME = 8,05 - 1,58 (X_1) - 0,473 (X_2) + 1,08 (X_1 X_2) \quad (11)$$

Onde: PME = Atividade da enzima pectina metilesterase (U/g_{bu});

X_1 = Quantidade de casca de laranja triturada (g);

X_2 = Quantidade de farelo de trigo (g).

De acordo com a Figura 14, verifica-se que há uma tendência de maximização da produção de PME em concentrações próximo a região de 2 g de água de maceração de milho e teores menores que 2 g de farelo de trigo, após 96 h de cultivo pelo agente biológico *A. niger* (5×10^6 esporos/g_{bu}). Em relação à utilização de casca de laranja, observa-se que a maximização da produção de PME ocorre em baixas concentrações (~ 12 g). Outros autores também constataram isto; Santi (2005) ao avaliar a produção de PME por fungo *P.oxalicum* observou que ao aumentar a concentração de casca de laranja diminui a atividade enzimática, e a melhor resposta foi quando utilizou 2 % do resíduo (3,0 U/mL) após 72 h de fermentação.

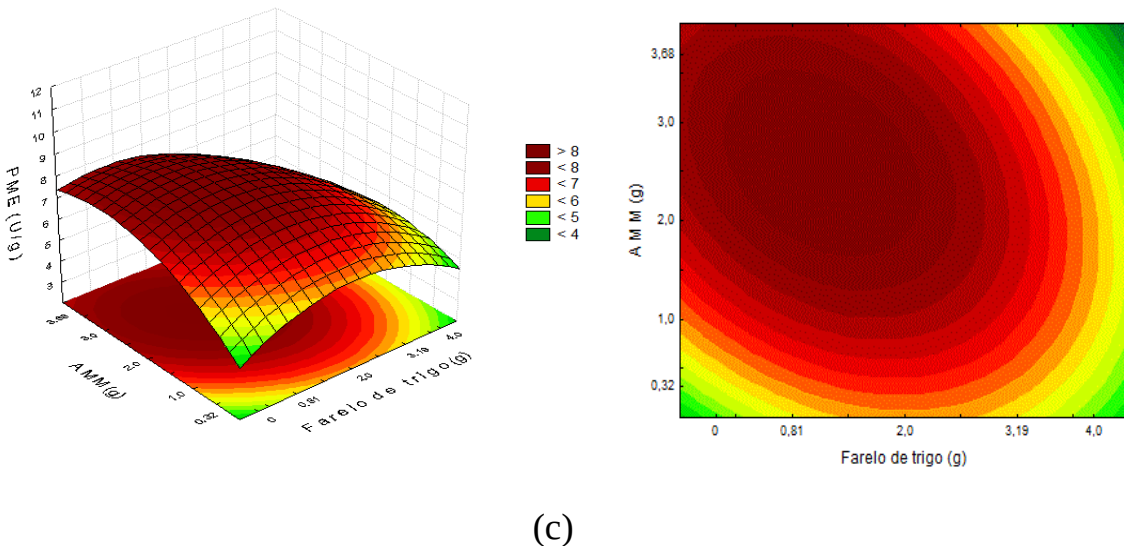
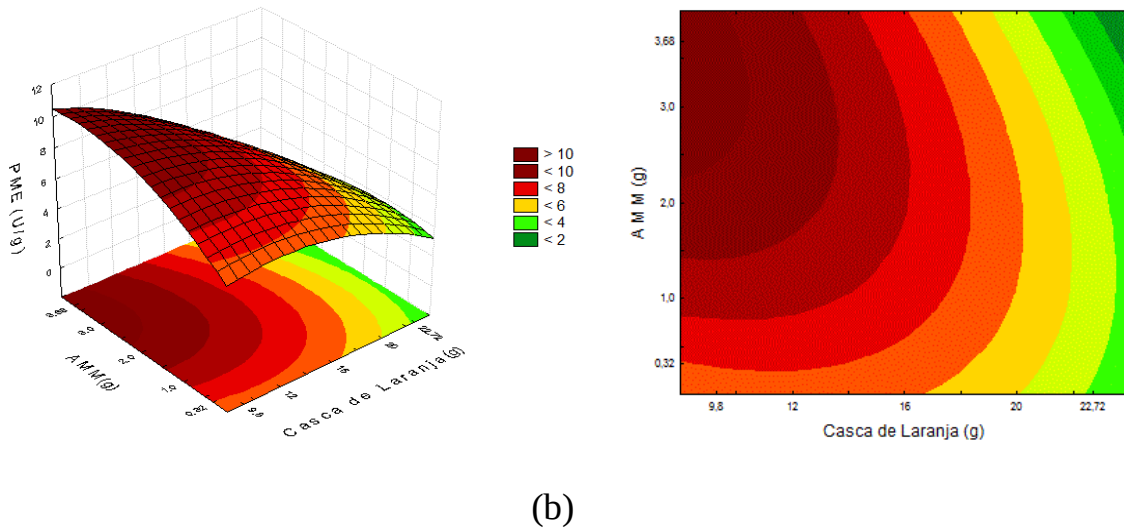
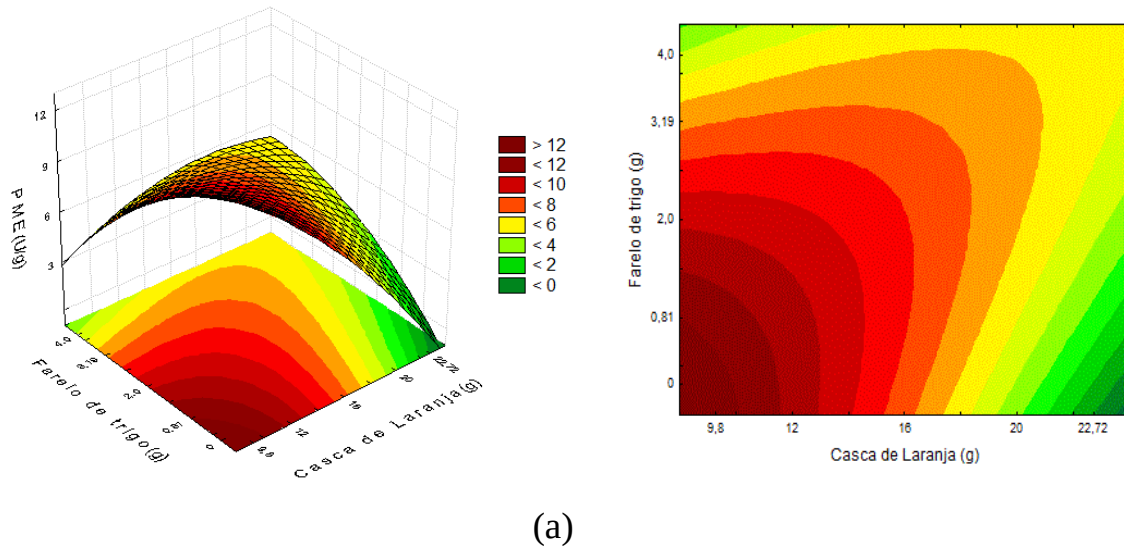


Figura 14: Superfícies de resposta (esquerda) e curvas de contorno (direita) na atividade da PME (U/g_{bu}) em função da quantidade em gramas de casca de laranja e farelo de trigo (a), casca de laranja e água de maceração de milho (b) e, farelo de trigo e água de maceração de milho (c). Condições de bioprodução: 5×10^6 esporos/g_{bu}, 65 % umidade, 30°C, 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Relação solvente:substrato: 10:1 (v/m). Condições de extração: 30 °C, 55 min, 180 rpm .

Segundo Hahn-Hägerdal *et al.* (2005), a adição de meio de cultivo complexo contendo fonte de nutrientes como aminoácidos, vitaminas e sais minerais melhora a performance da fermentação, além de proporcionar possível redução nos custos operacionais. Em relação aos substratos utilizados para a produção de PME, tem-se que água de maceração de milho sem pré-tratamento (Tabela 7 e 8) é rica principalmente em nitrogênio (30 mg/g) e magnésio (471 mg/g); a casca de laranja em pectina (3,4 %) e cálcio (784 mg/g); e o farelo de trigo em potássio (451 mg/g), magnésio (340 mg/g), cálcio (1045 mg/g), manganês (10 mg/g), zinco (5,5 mg/g) e ferro (10 mg/g).

4.4.3 Pectina liase – PMGL

De acordo com a Tabela 11, a máxima atividade para a enzima PMGL foi de 78,50 U/g_{bu} (224,3 U/g_{bs}) correspondente a 88,9 % de casca de laranja e 11,1 % de água de maceração de milho (ensaio 11), 65 % de umidade, 30°C, 96 h de bioprodução, pH_{inicial} de 4,3 e concentração de esporos de 5x10⁶ esporos/g_{bu}.

A Tabela 27 (Apêndice B) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da PMGL ao nível de confiança de 95 %. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 28, Apêndice B).

A Equação 12 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da pectina liase em função das variáveis analisadas, dentro da faixa estudada. Verifica-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo sobre a produção da enzima PMGL (Tabela 27, Apêndice B). O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 28, Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,83 e F_{calculado} de 1,18 vezes maior que F_{tabelado}, os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 15.

Equação 12:

$$PMGL = 57,35 - 4,29(X_1) - 4,88(X_1)^2 - 6,00(X_2) + 11,18(X_3) - 4,41(X_3)^2 + 1,59(X_1.X_2) \quad (12)$$

Onde: PMGL = Atividade da enzima pectina liase (U/g_{bu});

X₁ = Quantidade de casca de laranja triturada (g);

X₂ = Quantidade de farelo de trigo (g);

X₃ = Quantidade de água de maceração de milho (g).

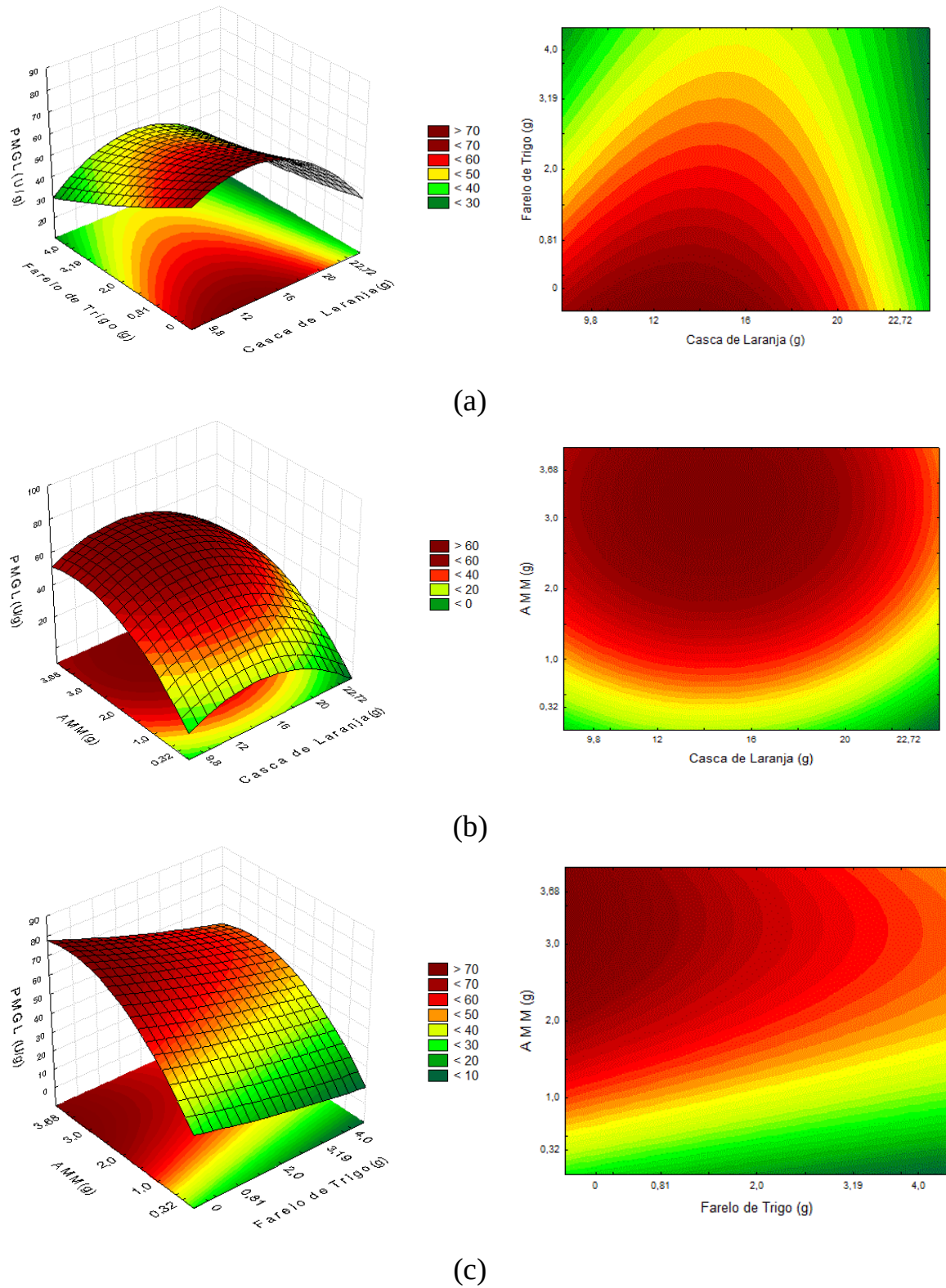


Figura 15: Superfícies de resposta (esquerda) e curvas de contorno (direita) na atividade da PMGL (U/g_{bu}) em função da concentração de casca de laranja e farelo de trigo (a), casca de laranja e água de maceração de milho (b) e, farelo de trigo e água de maceração de milho (c). Condições de bioprodução: 5×10^6 esporos/ g_{bu} , 65 % umidade, 30°C, 96 h. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Relação solvente:substrato: 10:1 (v:m). Condições de extração: 30 °C, 55 min, 180 rpm .

A Figura 15a demonstra a interação entre os substratos casca de laranja e farelo de trigo na bioprodução da enzima PMGL, demonstrando que ao diminuir a concentração de farelo de trigo (<0,81 g) e utilizando concentrações de casca de laranja na faixa de 12 a 16 g, há uma tendência de maximização da produção de PMGL. Na Figura 15b observa-se que o conteúdo de água de maceração de milho favorece a produção da enzima PMGL encontrando uma região de otimização da produção da enzima, correspondendo a concentrações na faixa de 12 a 16 g de casca de laranja e 2,5 a 3,5 g de AMM.

Yadav *et al.* (2012) ao utilizar uma mistura de casca de laranja, farelo de trigo e uma solução com sais minerais (1:1:2, m:m:v) a atividade enzimática de PMGL foi 95% menor comparada com a mistura de farelo de trigo e sais minerais (1:1 m:v), indicando que a presença de casca e bagaço de laranja, neste caso, não favoreceu a produção de PMGL por *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356.

Santi (2005), ao produzir a enzima PMGL em FS, utilizando diferentes concentrações de casca de laranja (0 - 3 %), observou que a produção da enzima foi estimulada em utilizando 1 % (9,6 U/mL) de casca, e que, ao utilizar alta (3 %) e baixa concentração (0,5 %) deste resíduo, diminui o rendimento da enzima secretada por *P. oxalicum*, após 96 h.

Silva *et al.* (2002) estudaram a produção de pectina liase, pela cepa *P. viridicatum* Rfc3 em FES, empregando bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e cascas de manga e banana como fonte de carbono. Quando os resíduos foram utilizados isoladamente, o valor máximo de atividade de PMGL (2000 U/g_{bs}) foi obtido em meio de bagaço de laranja após 4 dias de cultivo. Porém, utilizando a mistura de bagaço de laranja:farelo de trigo (1:1 m/m) elevou a produção de PMGL para 3540 U/g_{bs}, em 12 dias de fermentação.

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 (polpa, semente e casca) como única fonte de carbono e observaram que a atividade enzimática aumentou de 8 para 11,3 U/mL, com o aumento da concentração de substrato (0,5 a 4 %, m/v).

Frente a este estudo, acredita-se que os substratos selecionados atuarão tanto como fonte de nutrientes, quanto como suportes inertes para o crescimento e multiplicação dos micro-organismos e consequentemente na produção de enzimas.

4.5 CINÉTICA DA BIOPRODUÇÃO DAS PECTINASES EM CES

Para o estudo cinético da bioprodução foi avaliado o comportamento da atividade das enzimas exo-PG, PMGL e PME (U/g_{bu}), biomassa (mg/g_{bu}), pH e consumo de açúcares redutores totais (mg/g_{bu}) em função do tempo, empregando as condições otimizadas de bioprodução de cada enzima.

Para mensurar a concentração celular (biomassa) foi utilizado o método indireto de análise da glicosamina. Para tanto, primeiramente foi determinado o teor de glicosamina (mg) das amostras de micélio seco de *A. niger* ATCC 9642 cultivado em meio líquido, sendo que os valores obtidos foram correlacionados com a massa de biomassa seca do micro-organismo (mg), conforme mostra a Figura 27 (Apêndice D). A equação da reta foi utilizada para estimar a biomassa produzida em CES em diferentes tempos de fermentação e concentrações de substrato.

4.5.1 Cinética de bioprodução da exo-PG

Tendo em vista as condições pré-estabelecidas de bioprodução da exo-PG (9 g de casca de laranja, 3 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/ g_{bu} de meio fermentado) e extração (solvente de extração: NaCl 0,1 mol/L, relação solvente:substrato fermentação 10:1, 180 rpm, 30 min e 30 °C) foi realizado o estudo cinético do processo e os resultados da atividade das enzimas exo-poligalacturonase, pectina liase e petina metilesterase, pH e concentração celular ao longo de 204 h de cultivo apresentam-se na Figura 16. A máxima produção de exo-PG foi de 23,2 U/g_{bu} (68 U/g_{bs}) obtida em 192 h (Figura 16a). Na condição otimizada de bioprodução da exo-PG, a atividade máxima de PME e PMGL foi de 20,7 U/g_{bu} (59,1 U/g_{bs}) e 108,0 U/g_{bu} (308,6 U/g_{bs}) em 48 h e 192 h, respectivamente (Figura 16b).

Mata-Gómez *et al.* (2014) avaliaram a atividade de diferentes pectinases utilizando dois fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, inoculados em meio contendo açúcar de beterraba como fonte de carbono, e alta produtividade da exo-PG foi obtida após 4 dias de fermentação ($>700 \text{ U/g}$). Silva *et al.* (2002) utilizando resíduo de casca de laranja e farelo de trigo (1:1) em FES por *P. viridicatum* Rfc3 obtiveram a máxima atividade da exo-PG após 8 dias de fermentação ($\sim 48 \text{ U/g}_{bs}$).

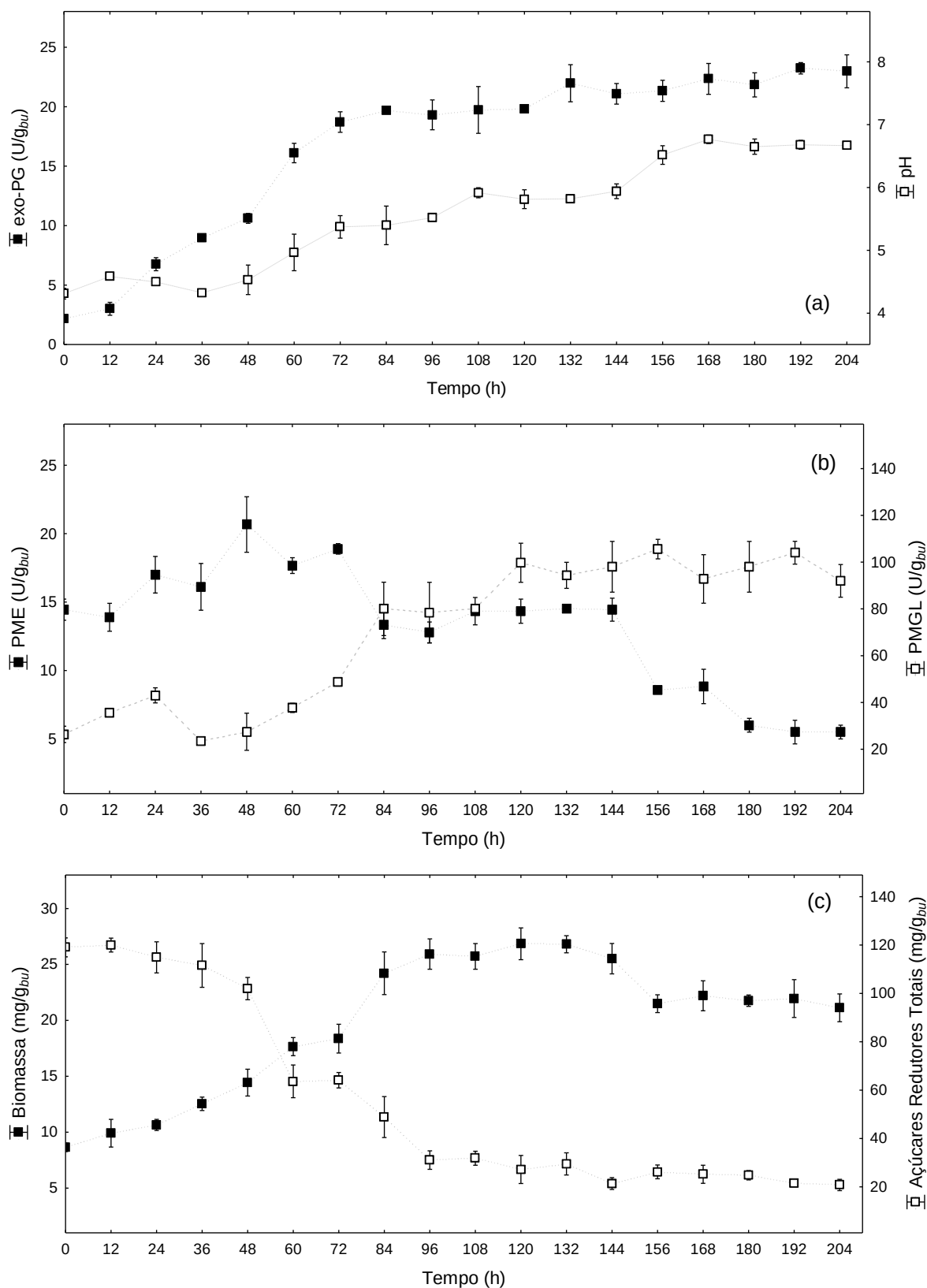


Figura 16: Estudo cinético da bioprodução de exo-PG e pH (a), atividade enzimática da PME e PMGL (b) e crescimento celular e açúcares redutores totais (c), em função do tempo. Condições de cultivo: 9 g de casca de laranja, 3 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Relação solvente:substrato: 10:1 (v:m). Condições de extração: 30 °C, 30 min, 180 rpm.

O pH do meio de fermentação (Figura 16a) apresentou um leve declínio nas primeiras 36 h (4,2) e a partir de 72 h o valor do pH voltou a aumentar atingindo aproximadamente 6,8, após 204 h de cultivo. Malvessi e Silveira (2004) avaliaram diferentes pH durante o cultivo de *A. oryzae* CCT3940 em frascos contendo farelo de trigo e pectina na produção da endo-PG. Poletto (2015) monitorou o pH do meio fermentativo da produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em FES em biorreator de tambor rotativo em escala de bancada e, também, constatou uma leve redução do valor inicial de 4,8 para 4,1 em 48 h e ao final do processo houve um aumento (5,1). O autor justifica que, possivelmente, esse comportamento seja devido a liberação de amônia resultante da quebra de proteínas e da oxidação de aminoácidos durante a utilização das fontes de carbono na produção de pectinases por *A. niger*, o que também foi relatado por Berovič & Ostroveršnik (1997) e Silva *et al.* (2005b).

Ao analisar os açúcares redutores totais (Figura 16c), observa-se um consumo lento nas primeiras 36 h (~120 mg/g_{bu}), caracterizado pela adaptação do micro-organismo ao meio. Após este período, constata-se um consumo progressivo, bem como, um incremento da biomassa e da produção de exo-PG, sendo que, em 84 h observa-se um consumo açúcares de aproximadamente 83 % e a produção de exo-PG de 23,8 U/g_{bu}.

A biomassa atingiu seu valor máximo de 27,0 mg/g_{bu} (77,1 mg/g_{bs}) após 84 h de cultivo (Figura 16c). O comportamento da curva apresentou um perfil clássico, uma vez que, observa-se a fase de adaptação nas primeiras 24 h, de multiplicação exponencial em 24 a 84 h e a fase estacionária, após 84h. Poletto (2015) encontrou um valor máximo de biomassa de aproximadamente 160 mg/g_{bs} após 60 h de incubação. Hendges *et al.* (2011) também avaliaram o teor da biomassa durante a produção da endo-PG por *A. niger* T0005/007-2 e obtiveram um valor máximo de biomassa de aproximadamente 100 mg/g_{bs} após 72 h de incubação.

Outros relatos podem ser observados na literatura sobre a cinética de bioprodução. Díaz *et al.* (2012), utilizando a tecnologia de FES e analisaram a evolução temporal da concentração de açúcares redutores, pH e a produção de exo-PG, por *A. awamori*, empregando como substrato apenas casca de laranja e uma mistura de casca de laranja e pomace de maçã. Os autores constataram que a concentração de açúcar cai drasticamente após 120 h de fermentação em ambas as condições; que o valor do pH diminui de 4,0 para 3,5 nas primeiras 3 h, subindo e mantendo-se constante (4,8) após 4 h e que a atividade enzimática atingiu um valor máximo em 14 dias de fermentação (16,9 U/g_{bs}), porém mantendo-se constante a partir de 96 h ao utilizar apenas casca de laranja, e 120 h

($\sim 5,5$ U/g_{bs}) ao utilizar uma mistura de casca de laranja e pomace de maçã na proporção de 1:1.

Souza *et al.* (2010) utilizando casca e albedo de maracujá (40 % de umidade e 1 % de fonte de nitrogênio) avaliaram o pH, consumo de açúcar redutor e atividade enzimática da PG durante 72 h. O pH ($\sim 4,9$) apresentou-se constante durante as 72 h de fermentação. Entre 7 e 22 h de cultivo, os autores observaram que não houve consumo de açúcares redutores no meio, diminuindo consideravelmente após esse tempo e a produção de PG atingiu um pico de atividade igual a 20,9 U/g_{bu} em 66 h de processo.

Fontana *et al.* (2005) acompanharam a produção de exo-PG (*A. niger* T0005007-2, farelo de trigo como fonte de carbono, 70 h), biomassa, pH e consumo de carboidratos totais. A máxima produção foi de 232 U/g_{bs} em 48 h. Avaliando a produção de biomassa, observaram que a fase lag estendeu-se até 10 h e a fase log até 48 h, tornando-se estacionária após esse tempo e atingindo a concentração máxima em 50 h de incubação (~ 120 mg/g_{bs}). O consumo de carboidratos foi de 70 % após 30 h de processo, obtendo uma quantidade inicial de 360 mg/g_{bs}, sendo praticamente consumido após 70 h de cultivo. Durante a fase exponencial, o pH caiu consideravelmente de 5,0 para 4,1, aumentando para 5,2 e mantendo-se constante após 48 h.

Há outros estudos retratados na literatura avaliando a evolução do pH, açúcar redutor, atividade enzimática e biomassa em diferentes tempos e utilizando como agente biológico, no processo de CES e CS, o gênero *Aspergillus* e como substrato, compostos orgânicos (BLANDINO *et al.*, 2002; BOTELLA *et al.*, 2005; BOTELLA *et al.*, 2007).

4.5.2 Cinética de bioprodução da PME

Definidas as condições de maximização da bioprodução de PME (12 g de casca de laranja, 0,81 g de farelo de trigo e 3 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu} de meio fermentado) e de extração (solvente de extração: NaCl 0,1 mol/L, relação solvente:substrato fermentação 10:1, 180 rpm, 55 min e 30 °C) foi realizado o estudo cinético em função do tempo da bioprodução das enzimas PME, consumo de açúcares redutores totais, biomassa e o pH. Nestas condições, também, determinou-se as atividades de exo-PG e PMGL. Os resultados deste estudo apresentam-se na Figura 17.

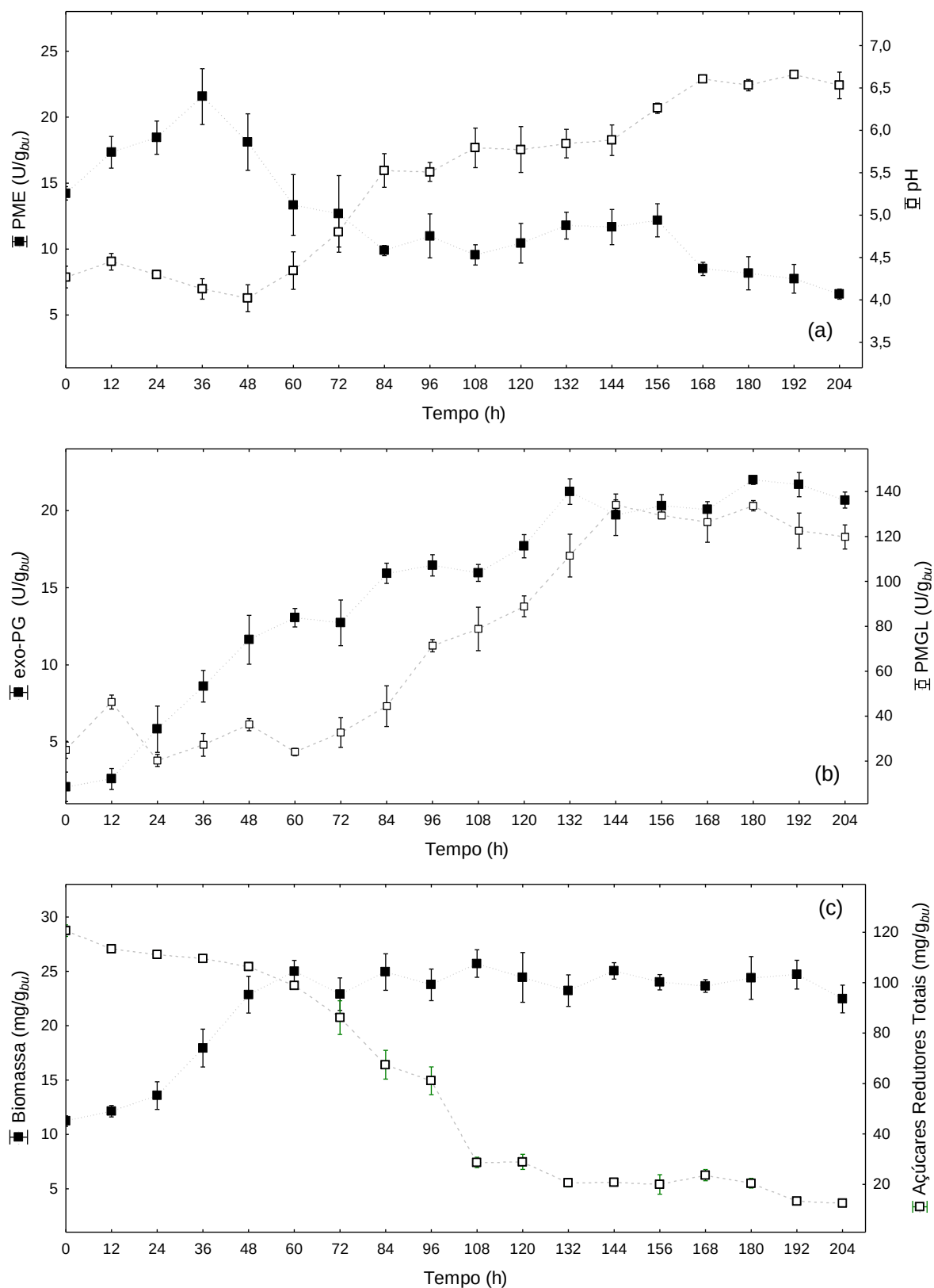


Figura 17: Estudo cinético da bioprodução de PME e pH (a), atividade enzimática da exo-PG e PMGL (b) e, biomassa e açúcares redutores totais (c), em função do tempo. Condições de cultivo: 12 g de casca de laranja, 0,81 g de farelo de trigo e 3 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Relação solvente:substrato: 10:1 (v:m). Condições de extração: 30 °C, 55 min, 180 rpm .

Conforme apresentado na Figura 17a, a máxima atividade da enzima PME foi de 21,6 U/g_{bu} (61,7 U/g_{bs}), obtida em 36 h de fermentação e após este período houve um decréscimo da atividade. Quanto às atividades das enzimas exo-PG e PMGL (Figura 17b), ao utilizar-se do meio otimizado da PME, observa-se que a produção foi de 22,1 U/g_{bu} (63,1 U/g_{bs}) e 134,1 U/g_{bu} (383,1 U/g_{bs}) após 180 e 144 h de produção, respectivamente.

Há alguns relatos na literatura avaliando a produção da PME em diferentes tempos de cultivo utilizando a tecnologia de fermentação submersa e apresentando esse comportamento de queda na atividade. Crotti *et al.* (1999) avaliaram a produção da enzima PME durante 72 h e o máximo valor da atividade foi obtido em 48 h (13 U/mL). Fawole e Odunfa (2003) obtiveram máxima atividade (49 U/mL) da PME em 96 h, decaindo drasticamente após esse tempo de fermentação.

O valor do pH, no meio de fermentação (Figura 17a), apresentou um leve declínio nas primeiras 48 h (4,0), seguido de uma aumento progressivo, atingindo em 168 h um pH de aproximadamente 6,5 e mantendo-se constante até o final. O consumo de açúcares redutores totais foi lento até as 48 h, pela adaptação do micro-organismo ao meio, e após este período o consumo foi de aproximadamente 73 % até as 108 h, permanecendo praticamente constante até o final (204 h).

Quando um meio de cultura é inoculado, os micro-organismos consomem seletivamente os nutrientes dissolvidos e os convertem em parte em biomassa, aumentando a concentração celular. Nas condições de cultivo da PME, a máxima concentração celular foi obtida em 60 h (Figura 17c), onde se observou o início da fase estacionária (26 mg/g_{bu}).

4.5.3 Cinética de bioprodução da PMGL

A Figura 18 apresenta o estudo cinético da bioprodução da PMGL, pH, consumo de açúcares redutores totais e biomassa, utilizando a condição otimizada de produção e extração de PMGL (16 g de casca de laranja e 2 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu} de meio, NaCl 0,1mol/L como solvente de extração, relação solvente:substrato fermentação 10:1, 180 rpm, 55 min e 30 °C).

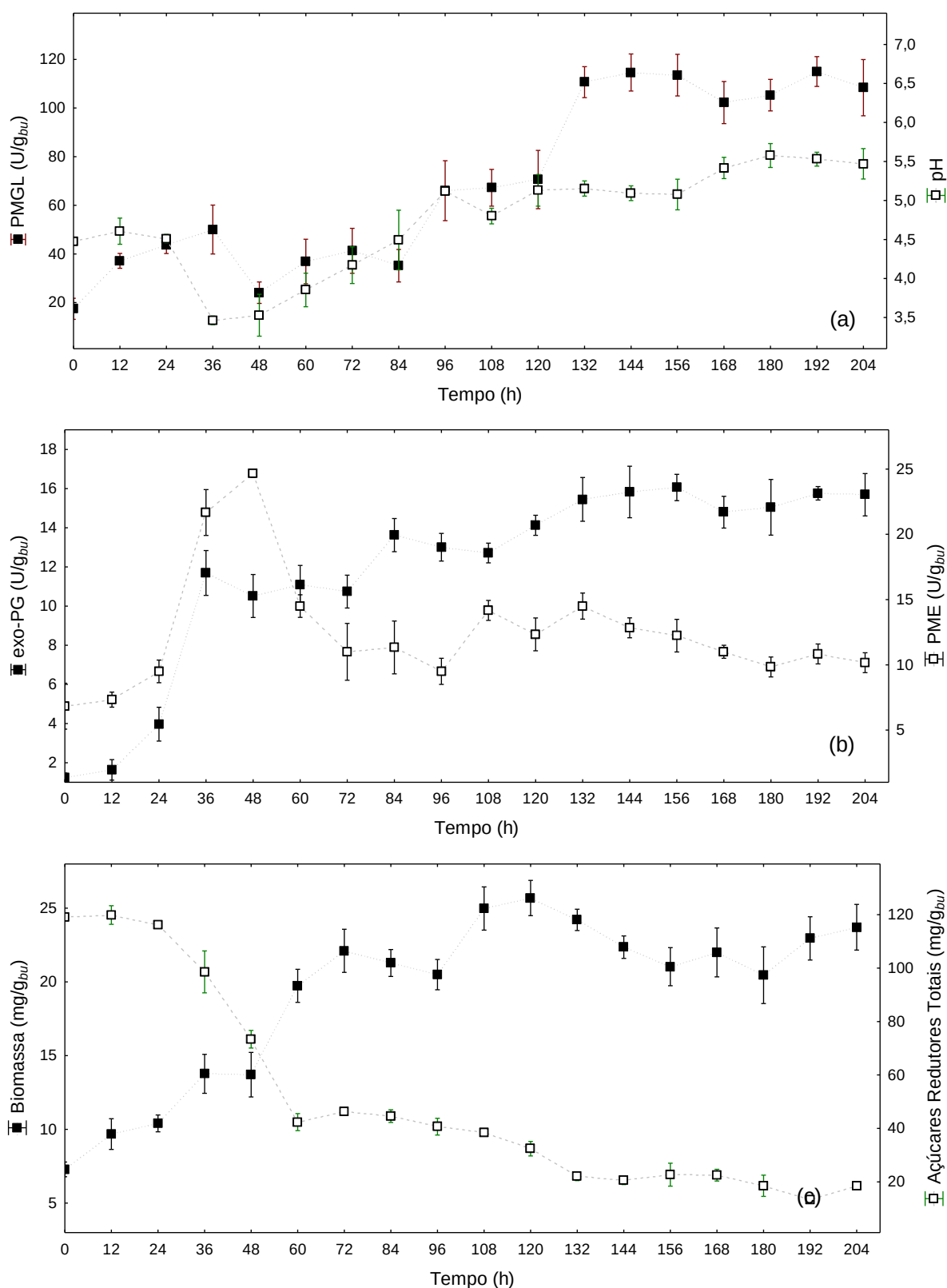


Figura 18: Estudo cinético da bioprodução de PMGL e pH (a), atividade enzimática da exo-PG e PME (b) e, biomassa e açúcares redutores totais (c), em função do tempo. Condições de cultivo: 16 g de casca de laranja e 2 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}. Solvente de extração: NaCl (0,1 mol/L). Relação solvente:substrato: 10:1 (v:m). Condições de extração: 30 °C, 55 min, 180 rpm.

A Figura 18a demonstra que a máxima produção de PMGL foi de 114,6 U/g_{bu} (327,1 U/g_{bs}) em 144 h, mantendo-se praticamente constante após esse tempo. A biomassa formada atingiu seu valor máximo em 120 h de fermentação estando associada à produção de PMGL. Este comportamento também foi relatado por Camargo *et al.* (2005) ao utilizar *Aspergillus* em meio de cultivo contendo bagaço de laranja como fonte de carbono e os resultados mostraram que a velocidade de produção da enzima pectina liase é mais acentuada em 168 h e que o acúmulo de biomassa no meio de cultivo foi proporcional ao aumento da síntese enzimática.

Mata-Gómez *et al.* (2014) avaliaram a atividade de pectinolítica de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* inoculado em meio contendo açúcar de beterraba como fonte de carbono e obtiveram a máxima produção da pectina liase após 8 h de fermentação, ao ser inoculado com *A. sojae* ATCC 20235 (79 U/g) e o mutante M3 (123 U/g). Silva *et al.* (2002) utilizando resíduo de casca de laranja e farelo de trigo (1:1) em cultivo CES por *P. viridicatum* obtiveram a máxima atividade da PMGL (~3000 U/g_{bs}) após 10 dias de fermentação.

O valor do pH do meio de fermentação (Figura 18a) apresentou um leve declínio nas primeiras 36 h (4,5 para 3,5). A partir de 48 h há um aumento progressivo até as 96 h (5,0), mantendo-se constante no intervalo de 96 a 156 h e, havendo ainda, um leve aumento (5,5) até o final da fermentação. A Figura 18b demonstra que a máxima produção da exo-PG e PME foi de 16,1 U/g_{bu} (46 U/g_{bs}) e 24,7 U/g_{bu} (70,5 U/g_{bs}) em 156 h e 48 h, respectivamente. Os açúcares redutores totais (Figura 18c) foram consumidos a partir de 24 h, sendo que o máximo consumo (~67 %) foi verificado no intervalo de 24 a 60 h, sendo que no intervalo entre 60 a 132 h houve um consumo de aproximadamente de 16 %.

Em face disso, os fungos filamentosos consomem seletivamente os nutrientes presentes no meio de cultura e os convertem, em parte, em biomassa, aumentando a concentração celular. Para melhor descrever a cinética de crescimento, pode-se definir alguns parâmetros relacionados com a concentração celular, consumo de substratos, velocidade específica de crescimento microbiano, rendimento e produtividade do processo. Portanto, a Tabela 13 representa um resumo dos valores máximos obtidos na cinética de bioprodução enzimáticas das exo-PG, PME e PMGL, bem como, o valor do pH inicial e final, concentração inicial de substrato, fator de produção específica, fator de conversão de substrato em enzimas, fator de conversão de substrato em células e produtividade mássica.

Tabela 13: Resultados gerais das condições otimizadas e/ou maximizada do processo de bioprodução das enzimas exo-PG, PME e PMGL pelo agente biológico *A. niger* ATCC 9642 em cultivo estado sólido.

	Exo-PG			PME			PMGL		
	Condição*			Condição			Condição		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
$P_{\max}$ (U/g _{bu})	23,2	22,1	16,1	20,7	21,6	24,7	108,0	134,1	114,6
$T_{p,\max}$ (h)	192	180	156	48	36	48	192	144	144
$X_{\max}$ (mg/g _{bu})	26,8	25,7	25,7	26,8	25,7	25,7	26,8	25,7	25,7
S_o (mg/g _{bu})	119,1	120,7	119,0	119,1	120,7	119,0	119,1	120,7	119,0
$S_{p,\max}$ (mg/g _{bu})	21,5	20,5	22,7	102,0	109,6	73,4	21,5	20,8	20,6
$S_{x,\max}$ (mg/g _{bu})	27,2	28,7	32,4	27,2	28,7	32,4	27,2	28,7	32,4
$Y_{p/X}$ (U/mg)	0,865	0,860	0,625	0,770	0,838	0,960	4,02	5,21	4,46
$Y_{p/S}$ (U/mg)	0,238	0,221	0,167	1,21	1,94	0,541	1,11	1,34	1,16
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,292	0,280	0,310	0,292	0,280	0,310	0,292	0,280	0,310
P (U/g _{bu} /h)	0,121	0,123	0,103	0,431	0,599	0,514	0,563	0,931	0,796
pH _{inicial}	4,31	4,27	4,48	4,31	4,27	4,48	4,31	4,27	4,48
pH _{final}	6,67	6,55	5,47	6,67	6,55	5,47	6,67	6,55	5,47

* Condições de cultivo: A: 9 g de CL, 4 g de FT e 7 g de AMM. B: 12 g de CL, 0,81 g de FT e 3 g de AMM. C: 16 g de CL e 2 g de AMM. $P_{\max}$ = máxima atividade enzimática obtida no processo (U/g_{bu}); $T_{p,\max}$ = tempo de processo em que ocorreu $P_{\max}$; $X_{\max}$ = máxima concentração celular obtida no processo; S_o = concentração inicial de substrato; $S_{p,\max}$ = concentração de substrato no instante em que ocorreu $P_{\max}$; $S_{x,\max}$ = concentração de substrato no instante em que ocorreu $X_{\max}$; $Y_{p/X}$ = fator de produção específica; $Y_{p/S}$ = fator de conversão de substrato em enzimas, $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em células; P = produtividade mássica.

Observa-se na Tabela 13 que o máximo valor de atividade da exo-PG (23,2 U/g_{bu}) foi obtido nas condições de cultivo otimizado para exo-PG (9 g de CL, 4 g de FT e 7 g de AMM), sendo que nesta condição obteve-se maior fator de produção específica (0,865 U/mg) e fator de conversão de substrato em enzimas (0,238 U/mg). A condição utilizada para produção da PMGL não favoreceu a produção da enzima exo-PG e a produtividade mássica foi máxima na condição otimizada da enzima PME (0,123 U/g_{bu}/h).

No processo de produção da enzima PME o máximo valor da atividade (24,7 U/g_{bu}) foi obtido na condição otimizada da PMGL (16 g de CL e 2 g de AMM) obtendo maior valor do fator de produção específica (0,960 U/mg) e de substrato em células (0,310 mg/mg), porém a produtividade mássica (0,599 U/g_{bu}/h) e de conversão de substrato em enzimas (1,94 U/mg) foi máxima na condição otimizada para PME (2 g de CL, 0,81 g de FT e 3 g de AMM). Por sua vez, a produção da enzima PMGL foi máxima na condição de cultivo otimizada da PME (134,1 U/g_{bu}), assim como, a produtividade mássica (0,931 U/g_{bu}/h).

Portanto, a utilização de um meio bem definido, o acompanhamento do crescimento celular e da produção de enzimas são parâmetros que auxiliam no dimensionando da produção em escala industrial. Segundo Hiss (2001), os critérios de comparação entre

diferentes condições são relativos, isto é, dependem do que se espera obter de um determinado processo fermentativo. Assim, quando o tempo de duração de cultivo for importante por razões econômicas, as produtividades devem ser empregadas como referências numéricas, em vez de algum fator de conversão. Por esse motivo, o tempo de bioprodução para os demais ensaios foram 84 h, 36 e 132 h para *exo-PG*, *PME* e *PMGL*, respectivamente.

4.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PECTINASES EM CES

Alguns fatores, tais como pH e temperatura, podem influenciar na velocidade da reação e na estabilidade enzimática. A definição das condições ideais, bem como, a avaliação da estabilidade das enzimas frente a diferentes condições de incubação são fatores importantes em aplicação industrial. Para tanto, buscou-se analisar as condições ótimas de temperatura e pH das enzimas *exo-PG*, *PME* e *PMGL* empregando a ferramenta de planejamento de experimentos, bem como, avaliar a estabilidade térmica e de pH.

4.6.1 Avaliação da temperatura e pH ótimos dos extratos brutos enzimáticos

Para a determinação dos valores de pH e temperatura ótima das enzimas pectinolíticas, produzidas em condições maximizadas e/ou otimizadas no cultivo estado sólido, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^2 e as respostas em atividades de *exo-PG* e *PMGL* apresentam-se na Tabela 14 e, de *PME*, na Tabela 15.

Temperatura e pH ótimo da *exo-PG*

A Tabela 14 mostram que a maior atividade da *exo-PG* foi de 26,23 U/g_{bu} (74,9 U/g_{bs}) em pH 4,5 e 55 °C (ensaios 9, 10 e 11). Os resultados (Tabela 14) foram tratados estatisticamente e as Tabelas 29 e 30 (Apêndice C) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, t(2) e análise de variância - ANOVA para a atividade da *exo-PG* ao um nível de confiança de 95 %.

Tabela 14: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) em função da temperatura e pH e as respostas em atividade de exo-PG e PMGL (U/g_{bu}).

Ensaio	Variáveis independentes*		Atividade enzimática (U/g _{bu})	
	X ₁	X ₂	exo-PG	PMGL
1	-1 (3,5)	-1 (37)	5,68	73,75
2	-1 (3,5)	1 (73)	5,95	57,60
3	1 (5,5)	-1 (37)	20,89	62,48
4	1 (5,5)	1 (73)	12,49	66,70
5	0 (4,5)	-1,41 (30)	20,84	55,23
6	0 (4,5)	1,41 (80)	11,18	66,35
7	-1,41 (3,09)	0 (55)	5,91	72,90
8	1,41 (5,91)	0 (55)	23,83	107,65
9	0 (4,5)	0 (55)	26,23	93,48
10	0 (4,5)	0 (55)	25,67	91,05
11	0 (4,5)	0 (55)	26,16	92,55

*X₁=pH, X₂=Temperatura (°C). Variáveis independentes fixas: solvente de extração: NaCl 0,1 mol/L, relação solvente:substrato 10:1 (v:m); processo de extração: 180 rpm, 30 °C, 30 min (exo-PG) e 180 rpm, 30 °C, 55 min (PMGL); tempo de fermentação: 84 h(exo-PG) e 132 h(PMGL).

Tabela 15: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) em função da temperatura e pH e as respostas em atividade de PME (U/g_{bu}).

Ensaio	Variáveis independentes*		Atividade enzimática (U/g _{bu})
	X ₁	X ₂	PME
1	-1 (4,2)	-1 (30)	9,67
2	-1 (4,2)	1 (60)	12,00
3	1 (9,8)	-1 (30)	40,33
4	1 (9,8)	1 (60)	52,50
5	0 (7,0)	-1,41 (24)	21,67
6	0 (7,0)	1,41 (66)	21,00
7	-1,41 (3,05)	0 (45)	0,67
8	1,41 (10,9)	0 (45)	67,20
9	0 (7,0)	0 (45)	21,00
10	0 (7,0)	0 (45)	21,67
11	0 (7,0)	0 (45)	20,67

*X₁=pH, X₂=Temperatura (°C). Variáveis independentes fixas: solvente de extração: NaCl 0,1 mol/L, relação solvente:substrato 10:1 (v:m); processo de extração: 180 rpm, 40 °C, 55 min; tempo de fermentação: 36 h.

A Equação 13 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da exo-PG em função das variáveis analisadas (pH e temperatura), onde verifica-se que as variáveis influenciaram significativamente ($p < 0,05$), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 30, Apêndice C), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,97 e $F_{calculado}$ de 3,55 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 19.

Equação 13:

$$\text{Exo-PG} = 26,03 + 5,90(X_1) - 6,65(X_1)^2 - 2,73(X_2) - 6,08(X_2)^2 - 2,17(X_1 X_2) \quad (13)$$

Onde: exo-PG = Atividade da enzima exo-poligalacturonase (U/g_{bu});

X_1 = pH;

X_2 = Temperatura (°C).

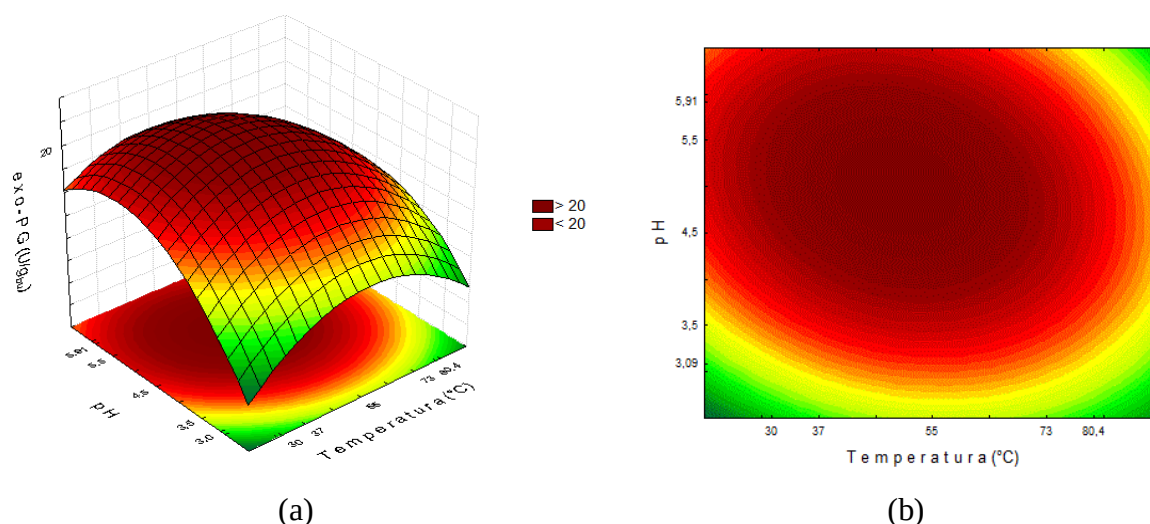


Figura 19: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da exo-PG (U/g_{bu}) em função do pH e da temperatura. Condições de cultivo: meio composto por 9 g de casca de laranja, 4 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 84 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 30 min.

Avaliando a Figura 19, observa-se uma região de ótica de pH e de temperatura, que se encontra na faixa entre 4,5 a 5,5 e 40 a 60 °C, respectivamente, utilizando para os próximos ensaios extrato bruto de exo-PG nas condições de pH 5 e temperatura de 50 °C.

Estes resultados, em CES, corroboram os obtidos por outros autores (DINU *et al.*, 2007; MALLER *et al.*, 2011; SANDRI *et al.*, 2013) que, ao empregar diferentes resíduos agroindustriais sólidos e o agente biológico *A. niger*, encontraram pH e temperatura ótimos na faixa de 4 - 5 e 40 - 55°C, respectivamente, para a poligalacturonase.

Para fins comparativos, foram avaliados resultados de pH e temperatura ótimos de outros micro-organismos na produção de PG em CES. Martins *et al.* (2013) utilizando casca de laranja com *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 atingiram atividade máxima de PG em pH 5 e 65 °C. Martin *et al.* (2004), empregando bagaço de laranja, cana de açúcar e farelo de trigo (1:1:1, m:m:m) com *Miniliella* sp. SB9 e *Penicillium* sp. EGC5 notaram atividades ótimas em temperaturas de 55 e 40 °C, respectivamente, em pH 4,5. Silva *et al.*

(2007), estudando a produção de exo-poligalacturonases por *P. viridicatum* RFC3 em meio composto de casca de laranja e farelo de trigo (1:1), mostraram que os melhores resultados foram em pH 6,0 e 60 °C. Freitas (2009), utilizando como substratos farelo de trigo, sabugo de milho e farelo de algodão por *Rhizopus pusillus* A13.36, verificaram os melhores resultados em pH 5,5 e 55 °C.

Na avaliação do pH e temperatura de reação, em extratos brutos obtidos pelo fungo filamentososo do gênero *Aspergillus* e no processo de CS utilizando resíduos agroindustriais ou meios sintéticos, são encontrados na literatura a faixa de valores ótimos de pH de 4 a 6 e de temperatura entre 40 a 60 °C, sendo muito similar a este trabalho (FREITAS *et al.*, 2006; PEDROLI, 2008; TARI *et al.*, 2008; EL-SHEEKH *et al.*, 2009; SANDRI *et al.*, 2015). Gomes *et al.* (2011), avaliando o efeito da temperatura e pH do extrato bruto obtido pelo mesmo fungo filamentososo empregado neste estudo (*A. niger* ATCC 9642), porém em CS e em meio sintético, obtiveram como melhor resultado pH de 5,5 e 37°C de temperatura ótima (73 U/mL). Há relatos também, neste mesmo sentido, porém utilizando outros gêneros de fungos no processo fermentativo. Damásio *et al.* (2011) analisaram o efeito do pH e temperatura da PG produzida por *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* em casca de limão encontrando valores ótimos de 3,5 e 65 °C. Ortega *et al.* (2004) e Ceci e Lozano (1998) verificaram que o pH e temperatura ótima de enzimas poligalaturonases comerciais foi de aproximadamente de 4,5 e 55 °C, respectivamente.

Temperatura e pH ótima da PMGL

Os resultados da Tabela 14 mostram que a maior atividade da PMGL foi de 107,65 U/g_{bu} (307,6 U/g_{bs}) em pH 5,91 e 55 °C (ensaio 8). Os resultados da Tabela 14 foram tratados estatisticamente ($p < 0,05$) e as Tabelas 33 e 34 (Apêndice C) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, $t(2)$ e análise de variância - ANOVA para a atividade da PMGL.

A Equação 14 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da pectina liase em função das variáveis analisadas (pH e temperatura) dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 34, Apêndice C), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,88 e $F_{calculado}$ de 1,2 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 20.

Equação 14:

$$PMGL = 92,40 + 6,18(X_1) - 3,81(X_1)^2 - 18,65(X_2)^2 + 5,72(X_1.X_2) \quad (14)$$

Onde: PMGL = Atividade da enzima pectina liase (U/g_{bu});

X_1 = pH;

X_2 = Temperatura (°C).

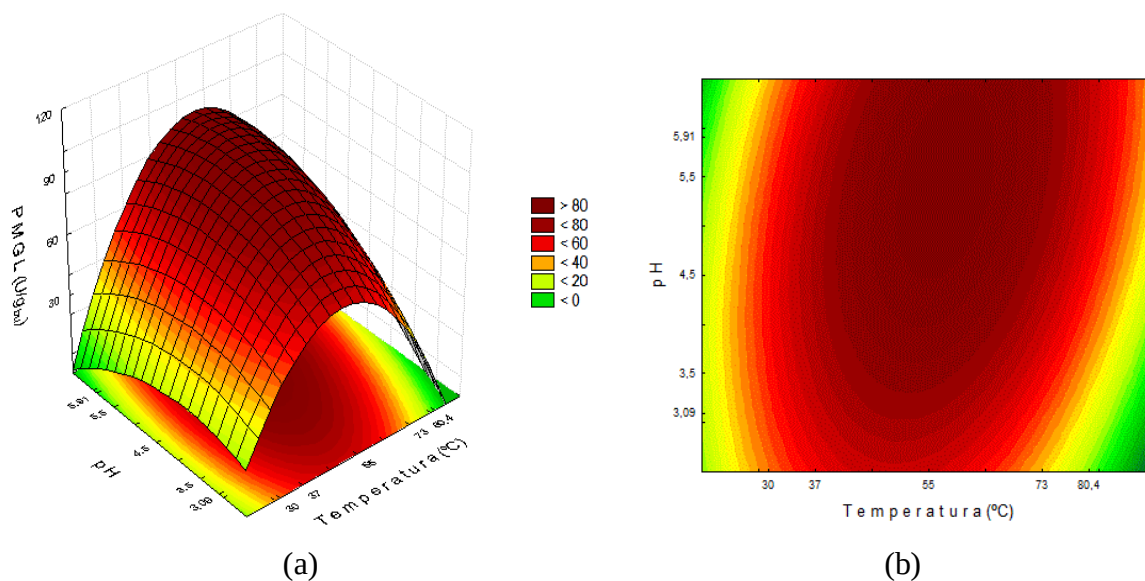


Figura 20: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da PMGL (U/g_{bu}) em função do pH e da temperatura. Condições de cultivo: meio composto por 16 g de casca de laranja e 2 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 132 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 55 min.

De acordo com a Figura 20 verifica-se que há uma região ótima de atividade de PMGL próximo a 5,5 e 55 °C, utilizando essa condição para os ensaios de estabilidade da PMGL. Resultados similares de pH e temperatura ótima da PMGL, em CES, podem ser encontrados na literatura. Poletto (2015) avaliou o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima pectina liase produzidas por *A. niger* LB-02-SF em meio sólido (farelo de trigo, como substrato de maior quantidade) e encontram valores ótimos na faixa de 5 e 6 de pH e 50°C. Dinu *et al.* (2007) avaliaram o extrato purificado produzido por *A. niger* MIUG16 obtiveram pH ótimo de 4,2 a 6 e temperatura de 35 a 50 °C.

Há relatos sobre esse estudo, também, em CES utilizando resíduos agro-industriais, porém utilizando outros gêneros de micro-organismos, como constatado no trabalho de Yadav *et al.* (2012) que utilizaram o agente biológico *Oidiodendron echinulatum* MTCC

1356, sendo pH e temperatura ótima de 7 e 50 °C, respectivamente, e Martins *et al.* (2002) (*Thermoascus aurantiacus*, pH 11, 65 °C).

Utilizando o processo de CS e o agente do gênero *Aspergillus* o pH varia de 4,5 a 8,5 e as temperaturas de 40 a 55°C (JAYANI *et al.*, 2005; PEDROLI, 2008; PEDROLI *et al.*, 2009; SOLÍS *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2009_b). Pedrolli e Carmona (2014) avaliaram o pH e a temperatura ótima da enzima PMGL no extrato enzimático purificado produzido pelo agente biológico *A. giganteus* CCT 3232, utilizando resíduo de laranja e o maior nível de atividade foi observada a 8,5 de pH e 50°C.

Em estudo realizado por Xu e seus colaboradores (2014), usando extrato enzimático purificado de *A. niger* ZJ5, foi encontrado a atividade ótima a 43 °C e pH 5. Martin *et al.* (2004) encontraram temperatura ótima da ação da enzima pectina liase entre 40 a 45 °C e pH de 9 a 10, porém, utilizando outras cepas de fungos. Ceci e Lozano (1998) verificaram que o pH e temperatura ótima de ação de enzimas pectinas liases comerciais foi de aproximadamente 5-6 e 40 °C, respectivamente. Valores de pH e temperatura ótima entre 6-9 e 40 a 55°C, respectivamente, da enzima PMGL produzida pelo gênero *Aspergillus*, podem ser observados em relato de De Vries e Visser (2001).

Temperatura e pH ótimo da PME

A Tabela 15 mostra que a maior atividade para PME foi de 67,2 U/g_{bu} (182,0 U/g_{bu}) com pH 10,9 e 45 °C (ensaio 8). Os resultados da Tabela 15 foram tratados estatisticamente ($p < 0,05$) e, as Tabelas 31 e 32 (Apêndice C) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, t(2) e análise de variância - ANOVA, para a atividade da PME.

A Equação 15 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da PME em função das variáveis analisadas (pH e temperatura) dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 32, Apêndice C), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,99 e $F_{calculado}$ de 12,35 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 21, bem como, definir as regiões de interesse.

A Figura 21 mostra que a PME apresenta um ótimo da atuação em temperatura acima de 45°C e pH acima de 9,8. Portanto, nos próximos ensaios foi utilizado as condições de pH 9,8 e 45 °C.

Equação 15:

$$PME = 21,10 + 20,68(X_1) + 6,69(X_1)^2 + 1,70(X_2) + 2,45(X_1.X_2) \quad (15)$$

Onde: PME = Atividade da enzima exo-poligalacturonase (U/g_{bu});

X_1 = pH;

X_2 = Temperatura (°C).

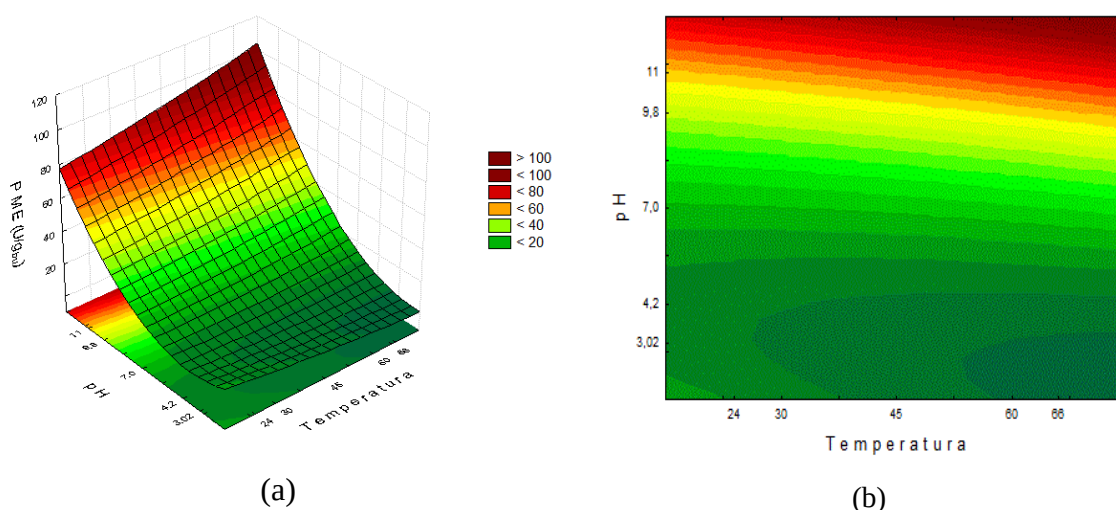


Figura 21: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da PME (U/g_{bu}) em função do pH e da temperatura. Condições de cultivo: meio composto por 12 g de casca de laranja, 0,81 g de farelo de trigo e 3 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 36 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 55 min.

Na literatura existem relatos de diferentes faixa de pH e temperatura ótima para PME variando em função da cepa e das condições de bioprodução. Dinu *et al.* (2007) avaliaram o extrato purificado produzido pelo micro-organismo *A. niger* MIUG16 em FES e obtiveram máxima atividade da PME em pH 4,2 - 4,4 e 40 °C. Jayani *et al.* (2005) relata que para o gênero *Aspergillus* os valores ótimos encontram-se em pH 4 - 5,5 e 50 °C. Glinka e Liao (2011) investigaram o pH e a temperatura da PME produzida por *Fusarium asiaticum* em FS e contataram ótimas atividades em pH 6,5 a 55 °C. Gonzalez e Rosso (2011) e Ceci e Lozano (1998) determinaram o pH e a temperatura ótima de amostras de pectinases comerciais e os resultados demonstraram maior atividade em pH 4,0-4,5 a 45 °C. Zeni *et al.* (2013), utilizando a ferramenta de planejamento experimental completo 2², avaliaram a temperatura e pH ótimos de reação da PME em FS, obtiveram praticamente o mesmo comportamento obtido neste trabalho, isto é, altos valores de atividade em pH 11 e temperatura de 55 °C. Já para PME extraída de frutas, foram relatados pH ótimo na faixa

de 7 a 9 e temperatura de 50 a 70 °C (VASU *et al.*, 2012; DIXIT *et al.*, 2013; SPELBRINK e GIUSEPPIN, 2014).

Contudo, o conhecimento de pH e temperatura de ação das pectinases é de suma importância no processo de aplicação industrial como relatado por Rodríguez-Nogales *et al.* (2007) e por Mohamed *et al.* (2009). Tomlin *et al.* (2013), empregaram enzimas comerciais no processo de clarificação de suco de maçã visando à redução da viscosidade, aumento do rendimento e clarificação do produto final. Esawy *et al.* (2013), aplicaram extrato bruto livre e imobilizado no processo de classificação de suco de laranja. Teixeira *et al.* (2013) utilizaram a enzima PG produzida por *Paecilomyces variotii* no processo de extração de óleo de palma.

4.6.2 Avaliação da temperatura e pH de estabilidade enzimática

Foi avaliada a estabilidade térmica do extrato bruto enzimático obtido da condição otimizada das enzimas exo-PG, PME e PMGL incubando-os em temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C, coletando amostra em intervalos de 1 (uma) hora, durante 8 h e, em temperaturas de -80, -10, 4 °C, durante 21 semanas para exo-PG e PME e 10 semanas para PMGL, coletando amostras a cada 7 dias. Para avaliar a estabilidade das enzimas exo-PG e PMGL frente ao pH, foi ajustado o pH do meio contendo extrato enzimático, nos valores de 3,0 a 8,0 e incubados a temperatura 50 °C (exo-PG) e 55 °C (PMGL), durante 8 h, avaliando a atividade enzimática periodicamente, e após 24 h. A estabilidade frente à temperatura e pH foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática.

Estabilidade da Exo-PG

Avaliando a estabilidade térmica do extrato enzimático bruto de exo-PG (Figura 22a) verifica-se que esta enzima manteve 80 % de sua atividade residual após 8 h e 6 h de incubação a 40 e 50 °C, respectivamente. No entanto, quando o extrato enzimático foi incubado a 60 e 70 °C manteve 50 e 40 % da atividade residual por aproximadamente 8 e 2 h, respectivamente. Ao armazenar os extratos enzimáticos em baixas temperaturas (Figura 22b) a atividade residual de exo-PG encontra-se acima de 70 % por 21 semanas nas temperaturas de congelamento (-80 e -10 °C) e durante 14 semanas sob refrigeração (4 °C).

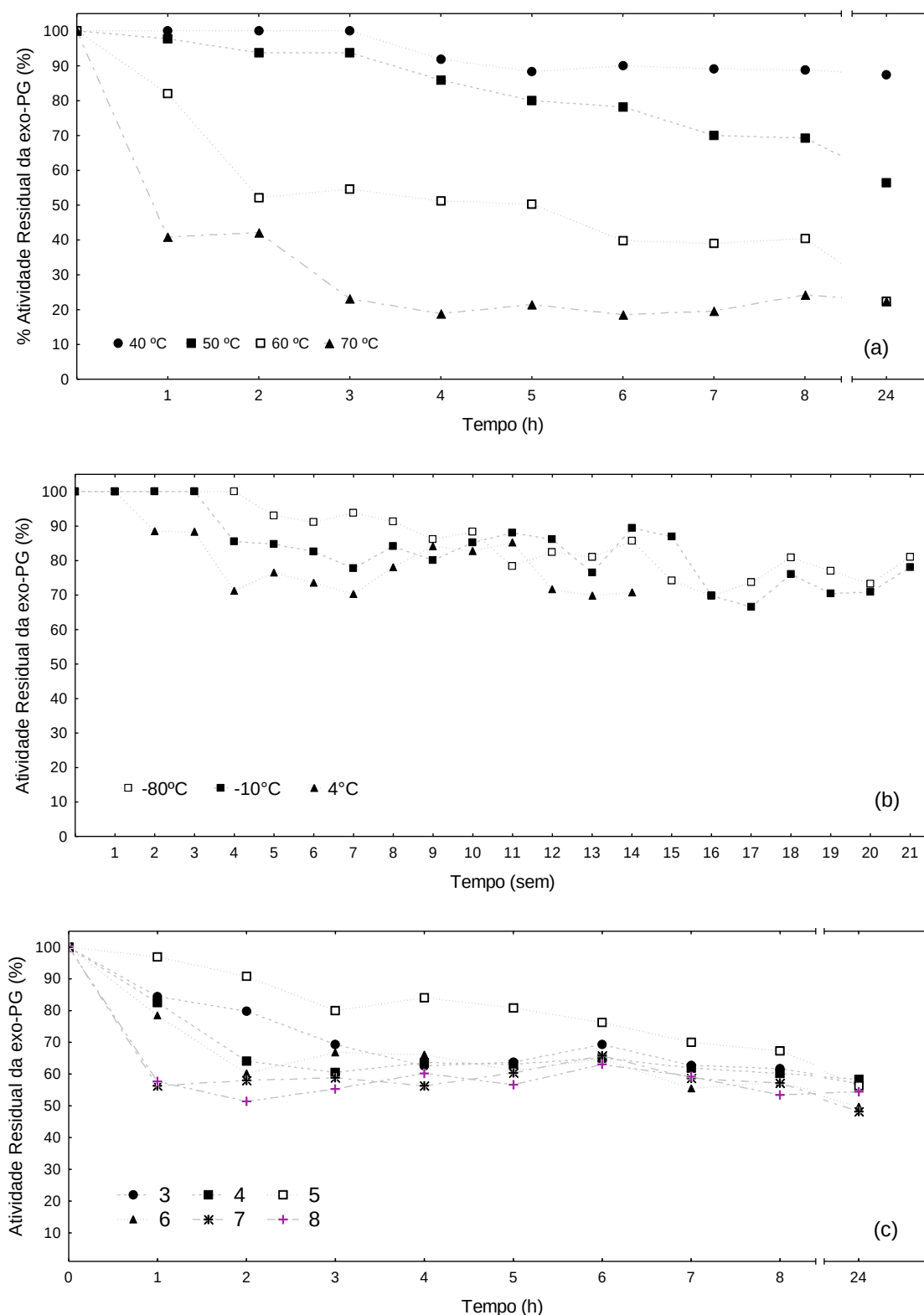


Figura 22: Efeito de altas (a) e baixas (b) temperaturas e do pH (c) na estabilidade do extrato bruto enzimático da exo-PG em função do tempo de incubação. Condições de cultivo: meio composto por 9 g de casca de laranja, 4 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/ g_{bu} , 84 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 30 min.

Com relação à estabilidade da exo-PG (Figura 22c) frente a diferentes valores de pH, observa-se a maior estabilidade da enzima nos valores de pH de 3 a 5, os quais mantêm a atividade residual superior a 70 % por uma hora.

Contudo, levando em conta a aplicação das enzimas pectinolíticas apresenta potencial para alimentos ácidos, tais como sucos de frutas, a utilização deste extrato obtido torna-se interessante. Os resultados obtidos de estabilidade, frente ao pH e temperatura, apresenta comportamento similar ao reportado na literatura, como observado nos trabalhos de Maller *et al.* (2011), Martins *et al.* (2013), Esawy *et al.* (2013), Martos *et al.* (2013) e Sandri *et al.* (2015). Maller *et al.* (2011) encontraram valores estáveis de pH entre 3 a 5, após 24 h de incubação a 60 °C, com um decréscimo de 15 % em pH 5,5 e 91 % em pH 8,0. A enzima PG, produzida por *A. niger* utilizando resíduos agroindustriais, reteve 91% de sua atividade após 90 min incubado à temperatura de 60°C e exauriu mais de 50 % em 10 min de armazenamento nas temperaturas de 65 e 70 °C. A máxima atividade da enzima PG foi observada em pH 4 e temperatura de 55 °C.

Estabilidade da PME

Ao analisar a estabilidade do extrato bruto enzimático de PME (Figura 23a) incubado em altas temperaturas (40 a 70 °C) verifica-se que manteve a atividade residual superior a 80 % em 24 h. Ao armazenar o extrato bruto enzimático de PME a -80 e -10 °C (Figura 23b) observa-se o mesmo comportamento em 21 semanas de armazenamento. A 4 °C as amostras mantiveram 80 % da atividade por 14 semanas.

Joshi *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade térmica (4°C/2 meses e 30 a 60 °C/72 h) da enzima PME purificada produzida pelo fungo filamentoso *A. niger* em FES utilizando pomace de maçã como substrato e constataram que a enzima é estável em temperaturas abaixo de 50°C durante o tempo de incubação. Gonzalez e Rosso (2011) avaliaram a estabilidade térmica de uma enzima comercial e observaram que 70 % e 100 % da atividade enzimática é perdida em 10 min nas temperaturas de 70 e 75 °C, respectivamente. Vasu *et al.* (2012) analisaram a estabilidade térmica da enzima PME presente em preparação comercial de papaína purificada e verificaram um decréscimo de mais de 75 % no valor da atividade enzimática da PME em menos de 5 min incubado a temperatura de 70 a 90°C. A estabilidade térmica da PME presente em vegetais também formam

analisados e podem ser visualizados em trabalhos realizados por Dixit *et al.* (2013), Spelbrink e Giuseppin (2014) e Ünal e Sener (2015).

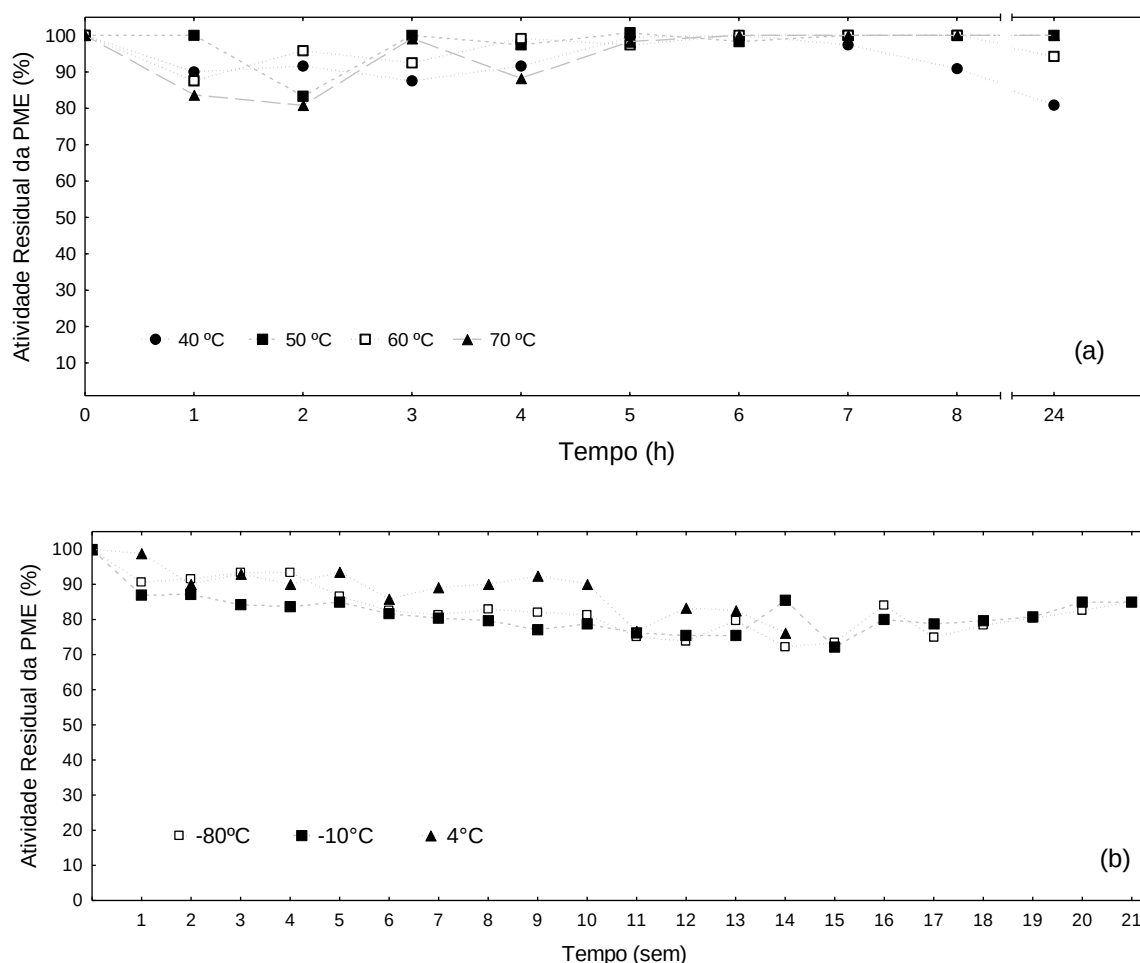


Figura 23: Efeito de altas (a) e baixas (b) temperaturas na estabilidade do extrato enzimático da PME em função do tempo de incubação. Condições de Cultivo: meio composto por 12 g de casca de laranja, 0,81 g de farelo de trigo e 3 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 36 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 55 min.

Estabilidade da PMGL

A Figura 24a apresenta o comportamento do extrato bruto enzimático de PMGL incubado nas temperatura de 40 a 70 °C. A maior estabilidade foi verificada na temperatura de 40 °C, a qual manteve 50 % de sua atividade residual durante aproximadamente 8 h. Ao armazenar o extrato bruto enzimático de PMGL em temperaturas de -80, -10 e 4°C (Figura 24b) verifica-se que a atividade residual de 50 % foi mantida por aproximadamente 6 semanas de armazenamento.

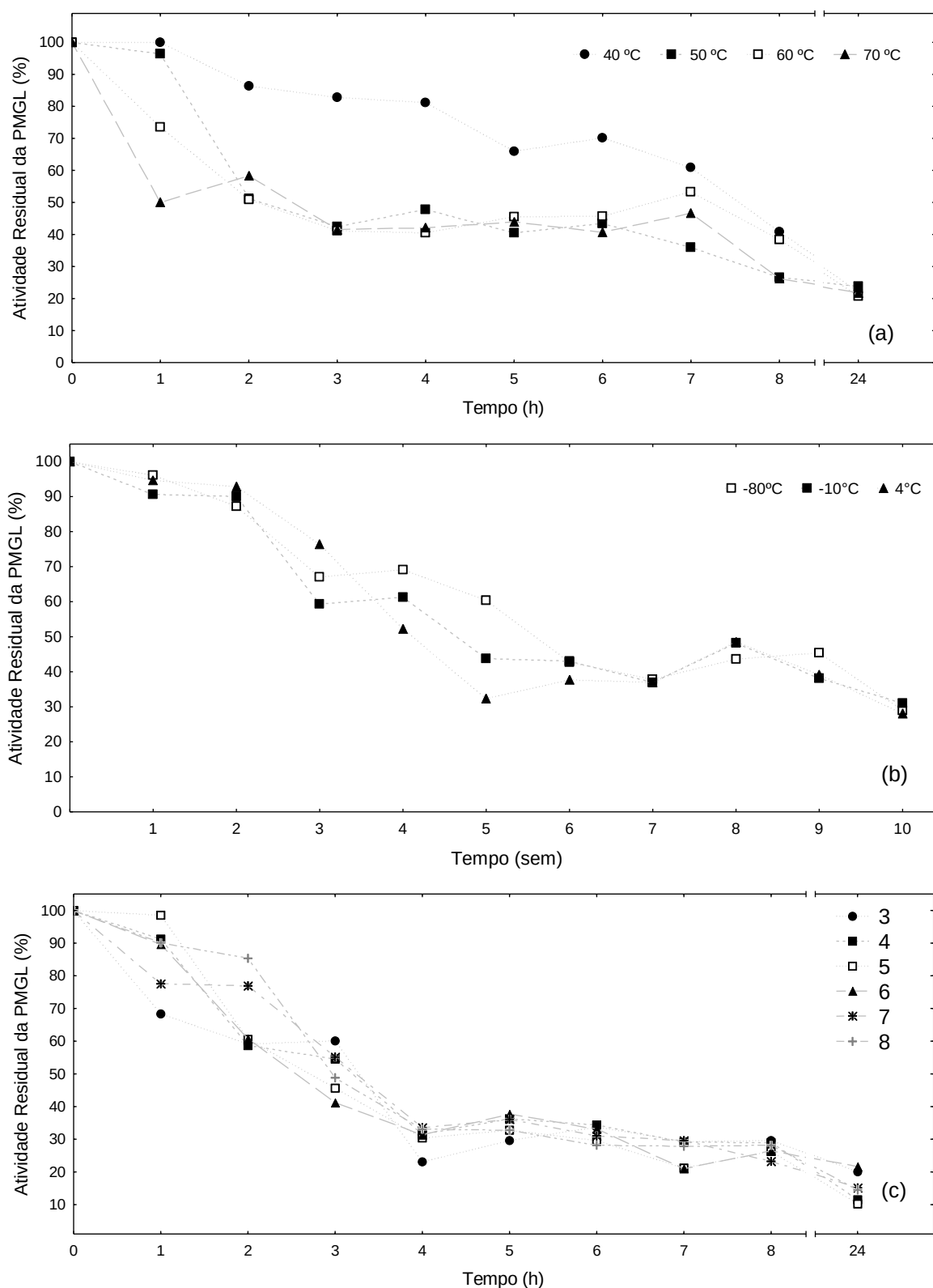


Figura 24: Efeito de altas (a) e baixas (b) temperaturas e do pH (c) na estabilidade do extrato enzimático da PMGL em função do tempo de incubação. Condições de cultivo: meio composto por 16 g de casca de laranja e 2 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/ g_{bu} , 132 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 55 min.

Pedrolli e Carmona (2014) armazenando o extrato enzimático purificado produzido por *A. giganteus* CCT 3232, em fermentação do submersa utilizando resíduo de laranja nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C/20 min, observaram que há uma perda de 50 % da atividade enzimática após 20 min, nas temperaturas estudadas, e que a enzima praticamente se desnatura após 15 min de incubação a 50°C.

Outros estudos podem ser observados avaliando pH e temperatura de estabilidade da enzima PMGL bioproduzida e comercial, observa-se que praticamente essa enzima mantém sua atividade em temperaturas abaixo de 60 °C e pH entre 4 e 7, dependendo da cepa (ORTEGA *et al.*, 2004; MARTIN *et al.* 2004; HAMDY, 2005; JAYANI *et al.*, 2005; YADAV *et al.*, 2009b).

4.7 APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO NA REMOÇÃO DE BIOFILME

A Figura 25 apresenta os resultados de remoção de biofilmes de *Pseudomonas* sp. previamente formado, adicionando extrato bruto enzimático nas proporções soluto/solvente (NaCl 0,1 mol/L) de 1:2,5, 1:5, 1:7,5 (g/mL) em diferentes tempos de contato (30 min, 60 e 360 min).

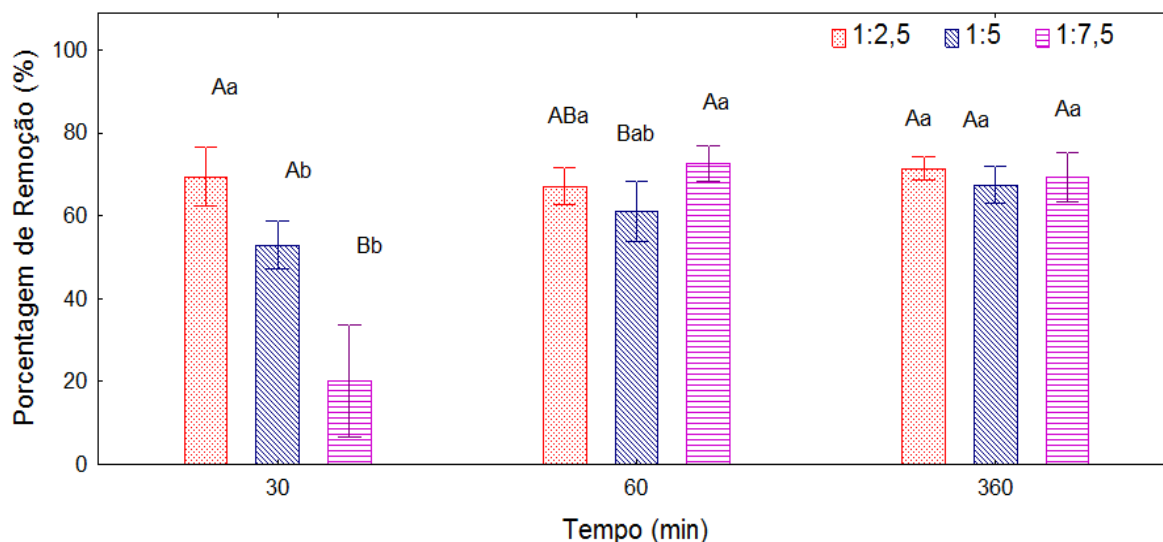


Figura 25: Percentual de remoção de biofilme bacteriano (*Pseudomonas* sp.) após tratamento com extrato enzimático em função do tempo de contato (30 a 360 min) e razão soluto:solvente de extração (1:2,5 a 1:7,5 m:v). Condições de cultivo: meio composto por 16 g de casca de laranja, 2 g de farelo de trigo e 3,68 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 96 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), 180 rpm, 30 °C, 30 min. Letras iguais maiúscula indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % entre diferentes concentrações de extração, hachuras diferentes (Teste de Tukey), letras iguais minúscula indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % (Teste de Tukey), entre as mesmas concentrações de extração, hachuras iguais.

Avaliando a Figura 25, pode-se constatar que não houve diferença significativa no percentual de remoção de biofilmes em diferentes tempos de contato ao utilizar um extrato com maior concentração de metabólitos, 1:2,5 (m:v), removendo praticamente 70 % do biofilme formado por *Pseudomonas* sp obtida de tanque de expansão de resfriamento de leite. A remoção de biofilme foi mínima ao manter o extrato enzimático durante 30 min utilizando a concentração de 1:7,5 (m:v), porém, ao aumentar o tempo de contato, nesta mesma concentração, observa-se um aumento na taxa de remoção de biofilme, não diferindo significativamente ($p>0,05$) das demais concentrações.

Na sequência, foram avaliados diferentes tempos de contato (10, 15, 20 e 120 min) na remoção do biofilme utilizando a concentração de extrato bruto enzimático de 1:2,5 (m:v) e observa-se, na Figura 26, que ao utilizar extrato bruto enzimático mais concentrado, 10 min foram suficientes para remoção de 77 % do biofilme bacteriano.

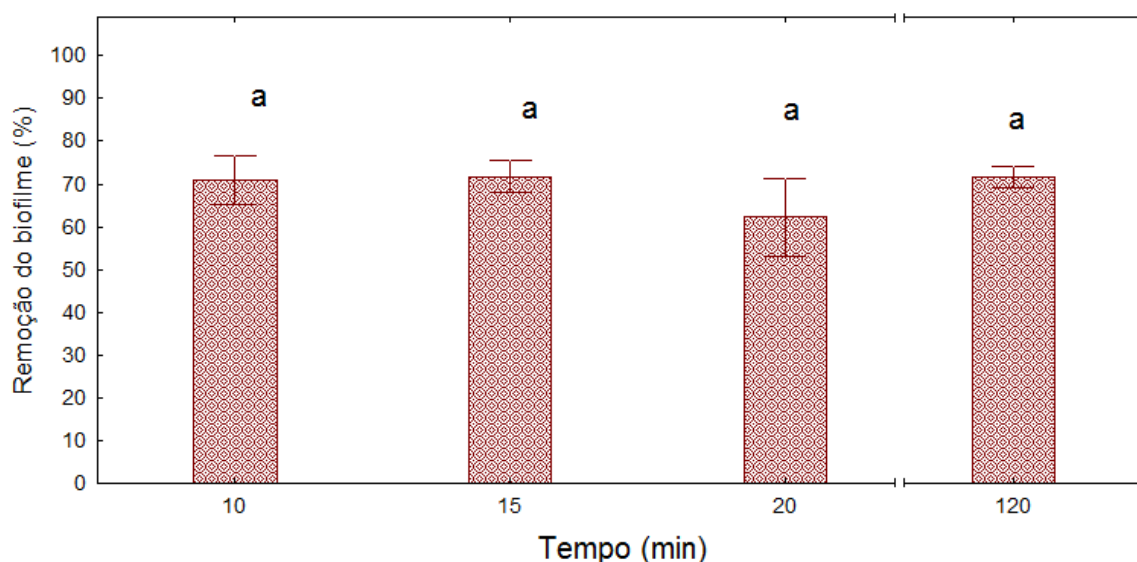


Figura 26: Percentual de remoção de biofilme bacteriano (*Pseudomonas* sp.) após tratamento com extrato enzimático, na concentração de extração de 1:2,5 (m:v), em função do tempo de contato (10 a 120 min). Condições de cultivo: meio composto por 16 g de casca de laranja, 2 g de farelo de trigo e 3,68 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}, 96 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), 180 rpm, 30 °C, 30 min. Letras iguais minúscula indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % (Teste de Tukey).

Ao comparar os valores da Densidade Ótica (DO) das amostras que foram tratadas com extrato enzimático, em diferentes tempos de contato e diluição de extração, com a DO, do controle de esterilidade (sem biofilme e sem extrato enzimático), observou-se que os valores ficaram muito próximos (dados não mostrados), indicando que a remoção do

biofilme foi praticamente completa, constatando que as condições de cultivo (casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho, *A. niger* ATCC 9642) e de recuperação selecionados, neste estudo, possibilitaram a extração de um extrato bruto enzimático que apresentou potencial para ser empregados em superfície de equipamentos, utilizados em linha de processamento de leite e derivados, como agente anti-incrustante.

Escassas são as informações na literatura sobre a utilização de extratos enzimáticos na remoção de biofilmes microbianos aderidos às superfícies de equipamentos de linha de processamento de alimentos e bebidas. Orgaz *et al.* (2006) avaliaram a capacidade de remoção de biofilme formado por *Pseudomonas fluorescens*, utilizando o sobrenadante da fermentação submersa produzido por três cepas de fungos diferentes (*A. niger*, *Trichoderma viride* e *Penicillium* spp) e obtiveram uma remoção de 84 e 60 % ao empregar extrato obtido do agente biológico *T. viride* e *A. niger*, respectivamente. Ao aplicar o sobrenadante, da fermentação produzida por *A. niger*, obtiveram uma remoção de 60 % do biofilme após 1 h de contato. Os autores relatam que há possibilidade da remoção do biofilme não seja somente causada pela ação das enzimas testadas (pectina esterase, polygalacturonase, pectina liase, proteinase, cellulase, alginate lyase e arabinase), podendo ser influenciado, também, por outros metabólitos formados durante a bioprodução.

Outro fator, que também pode ser vinculado a esta remoção do biofilme microbiano, poderá estar associado ao sinergismo entre o complexo enzimático formado com distintas atividades. Zanaroli *et al.* (2011) analisaram a ação de enzimas hidrolíticas comerciais (α -quimotripsina, ficina, α -amilase, celulase e lipase) sobre os componentes das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) presentes no biofilme bacteriano, formado por *Pseudoalteromonas* e *Rhodobacter*, e constataram que nenhuma das enzimas estudadas foi capaz de inibir a formação de biofilme quando aplicado isoladamente. No entanto, uma mistura destas mesmas enzimas apresentou um percentual de redução de 90%, sem afetar crescimento planctônico da mesma comunidade microbiana.

Em função disso, devido à heterogeneidade EPS, uma mistura de enzimas pode ser necessária para eficiente degradação do biofilme. Para tanto, avaliou-se a atividade enzimática da exo-PG, PME, PMGL, FPase, CMCCase e Xilanase do extrato enzimático obtido do CES. Conforme mostra a Tabela 16, as enzimas que apresentaram maior atividade hidrolítica foram a PMGL e xilanase, indicando que há possibilidade da ação dessas enzimas seja mais intensa no processo de remoção do biofilme formado por *Pseudomona* sp em tanque de expansão de refrigeração de leite cru.

Tabela 16: Valores das atividades das enzimas pectinases, celulases e hemicelulases no extrato bruto enzimático, obtido da diluição 1:2,5 (m:v) e utilizado na remoção de biofilme de *Pseudomonas* sp.

Enzimas	Atividade enzimática (U/mL)
Exo-Poligalacturonase (Exo-PG)	1,93 ± 0,67
Pectina metilesterase (PME)	3,55 ± 0,03
Pexina liase (PMGL)	26,5 ± 5,11
FPase	0,15 ± 0,047
Carboximetilcelulase (CMCase)	0,18 ± 0,001
Xilanase	32,0 ± 0,11

Condição de cultivo: meio composto por 16 g de casca de laranja, 2 g de farelo de trigo e 3,68 g de água de maceração 65 % de umidade, 5×10^6 esporos/g_{bu}. Condição de extração: NaCl (0,1 mol/L), 180 rpm, 30 °C, 30 min. Condição de reação: tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, pH 5,5, 37 °C, 6 min (exo-PG); NaCl 0,2 mol/L, pH 7,0, 30°C, 10 min (PME); tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 4,5, 55 °C, 20 min (PMGL), tampão citrato de de sódio 0,05 mol/L, pH 5,3, 50°C, 60 min (FPase); tampão citrato de de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, 50°C, 30 min (CMCase); tampão citrato de de sódio 0,05 mol/L, pH 5,3, 50°C, 5 min (Xilanase).

Na literatura, encontram-se trabalhos sobre a aplicação de enzimas comerciais na remoção e a prevenção de biofilme formado em equipamentos da indústria de alimentos, papel, celulose e placas dentárias (LEQUETTE *et al.*, 2010; CORDEIRO e WERNER, 2011; TORRES *et al.*, 2011; MARCATO-ROMAIN *et al.*, 2012). Lequette *et al.* (2010) sugerem uma combinação de enzimas, componentes tensoativos, dispersantes e agentes quelantes como a alternativa eficaz de agentes de limpeza de superfícies de equipamentos. Oulahal-Lagsir *et al.* (2003) utilizaram uma combinação de tratamento ultrasônico e preparação de enzimas para avaliar a eficiência da remoção de biofilme formado por *E. coli* em superfície de aço inoxidável. Torres *et al.* (2011) avaliaram 17 enzimas comerciais na prevenção de biofilmes formados em biorreatores de fluxo contínuo e constataram que a ação da pectina metilesterase, uma enzima encontrada na formulação de duas das misturas testadas, foi identificado como um composto ativo, capaz de reduzir a formação de biofilme em 71% em comparação com ensaios de controle.

Johansen *et al.* (1997) avaliaram a ação da enzima comercial Pectinex Ultra SP (preparação enzimática de multicomponentes contendo a atividade da protease, pectinase, arabanase, celulase, hemicelulase, b-glucanase, xilanase) sobre os biofilmes formados por *S.aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* e constataram uma redução significativa no número de células bacteriana presente no meio, indicando que a atividade da enzima é devido principalmente pela degradação de polissacarídeos extracelulares, sem qualquer atividade bactericida significativa contra qualquer das quatro estirpes estudadas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise dos resultados desse trabalho indica que o extrato bruto enzimático obtido do cultivo estado sólido, em escala de bancada, utilizando resíduos agroindustriais e o agente biológico *A. niger* ATCC 9642 apresentou atividade enzimática de exo-PG, PME e PMGL, sendo possível destacar algumas particularidades.

- ✓ A casca de laranja é fonte de pectina (3,4 %_{bu}), Ca (784 mg/g) e Mg (163 mg/g). Água de maceração de milho, apresentou maiores teores de minerais totais (7,45 %_{bu}), Mg (472 mg/g), Ca (269 mg/g) e K (86 mg/g). O farelo de trigo, por sua vez, é fonte de Mn (10 mg/g), K (451 mg/g), Ca (1045 mg/g), Mg (339 mg/g), Fe (10 mg/g), Zn (6 mg/g) e N₂ (26 mg/g).
- ✓ Foi possível obter um processo otimizado de bioprodução e recuperação de enzimas pectinolíticas utilizando combinações de fatores intrínsecos (umidade, pH e composição do meio fermentativo) e extrínsecos (tempo, temperatura e velocidade de agitação no processo de extração). A máxima atividade enzimática da exo-PG foi de 15,6 U/g_{bu} (44,6 U/g_{bs}) ao empregar meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5x10⁶ esporos/g_{bu}, 96 h e pH ~4,5.
- ✓ A utilização de diferentes solventes e soluções extratoras influenciaram no processo de recuperação sólido-líquido, sendo que o NaCl (0,1mol L⁻¹) apresentou como solvente adequado para a extração das pectinases. Os parâmetros que possibilitaram a maior recuperação de exo-PG, PME e PMGL foram as condições de 30°C e 180 rpm, por um tempo de contato de 30 min para exo-PG e 55 min para PME e PMGL. Enzimas obtidas do CES foram recuperadas do meio fermentativo após sucessivos ciclos de extração, não havendo necessidade de etapas subsequentes de homogeneização.
- ✓ A composição dos substratos influenciou na atividade de cada pectinase em estudo, pois o uso de diferentes concentrações apresentou distintos valores de atividade enzimática. Exo-poligalacturonase apresentou valor de atividade máxima de 20,3 U/g_{bu} (58 U/g_{bs}) em meio composto por 9 g de casca de laranja, 4 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho, após 96 h de cultivo. A máxima atividade obtida para a enzima PME foi de 11,0 U/g_{bu} (31,4 U/g_{bs}) utilizando meio composto por 12 g de casca de laranja triturada, 0,81 g de farelo de trigo e 3 g de

água de maceração de milho e para a enzima PMGL foi de 78,5 U/g_{bu} (224,3 U/g_{bs}) em meio composto por 16 g de casca de laranja triturada e 2 g de água de maceração de milho. O componente farelo de trigo de forma geral não contribuiu significativamente para o aumento da produção das pectinases em estudo, porém bons rendimentos foram obtidos ao utilizar esse tipo de substrato sólido de baixo custo.

- ✓ O crescimento celular e a formação do produto foram avaliados na cinética de bioprodução durante 204 h e o máximo valor de atividade foi de 23,2 U/g_{bu} (66,3 U/g_{bs}), 24,7 U/g_{bu} (70,6 U/g_{bs}) e 134,1 U/g_{bu} (383,1 U/g_{bs}), para exo-PG, PME e PMGL, respectivamente. O pH apresentou uma leve queda nas primeiras 36 horas de cultivo e aumentou ao longo da fermentação atingindo um valor de 6,67, 6,55 e 5,47 nas condições de cultivo otimizada para exo-PG, PME e PMGL, respectivamente. Aproximadamente 85% da concentração de açúcares redutores totais foram consumidos após 204 h de cultivo. A máxima concentração celular foi de 26,8 mg/g_{bu} para exo-PG e 25,7 mg/g_{bu} para PME e PMGL.
- ✓ As enzimas em estudo apresentaram diferentes valores de pH e temperatura ótima e de estabilidade. A caracterização parcial do extrato da exo-PG indicou máximo valor de atividade de 23,2 U/g_{bu} (74,9 U/g_{bs}) em pH e temperatura ótima na região de 4,5 e 55°C. Em relação à estabilidade de exo-PG, 50 % da atividade foram inativadas após uma hora de incubação a 70 °C e a enzima é mais estável em pH ácido. Na caracterização da PME, o valor de pH e temperatura ótima foi encontrado na região próxima a 10,9 e 45°C (67,2 U/g_{bu} ou 182,0 U/g_{bs}), não havendo perda de atividade em diferentes temperaturas de armazenamento. Quanto a caracterização da PMGL, valores ótimos foram encontrados em pH 5,91 e 55°C e a atividade residual foi de 50 % após 4 horas de incubação em diferentes pH e nas temperaturas de 50 a 70 °C. Em baixas temperaturas de armazenamento as enzimas exo-PG e PME apresentaram perda mínima de estabilidade após 21 semanas de incubação. Fato esse não observado à enzima PMGL, que perdeu mais de 50 % de sua atividade após 6 semanas de armazenamento sob congelamento e refrigeração.
- ✓ Ao utilizar extrato bruto diluídos (1:7,5, m:v) observou-se que a eficiência da remoção de biofilme foi 50 % menor comparado com outras diluições, no tempo de contato de 30 min. Em tempos de contato de 1 e 6 h não houve diferença significativa no processo de remoção do biofilme entre diferentes razão soluto/solvente, removendo aproximadamente 70 % do biofilme formado por

Pseudomonas sp. Ao avaliar o processo de remoção utilizando extrato bruto mais concentrado (1:2,5, m:v), obteve percentual de remoção de 77 % após 10 min de contato. Há possibilidade de enzimas polissacarídicas estarem agindo sinergeticamente na quebra da matriz polimérica do biofilme. Dependendo do interesse, diferentes concentrações de extração e tempo de contato podem ser aplicadas em escala industrial.

O extrato bruto enzimático, obtido do cultivo estado sólido (base de casca de laranja, farelo de trigo, água de maceração de milho e por *A. niger* ATCC 9642) atende aos requisitos necessários de aplicação em processamento de alimentos e bebidas e na remoção de biofilmes bacterianos. Os resultados obtidos de pH e temperatura ótima da enzima PME, por exemplo, nos permite, também, indicar seu uso, na indústria química.

Como perspectiva futura, recomenda-se realizar estudos de purificação, imobilização e aplicação do extrato enzimático. Há, também, possibilidade de estudo da produção em escala piloto, destacando a modelagem, simulação e controle de processo.

Recomenda-se investigar, mais profundamente, a respeito do processo de remoção de biofilmes. Como sugestões: incubar o extrato enzimático em diferentes temperaturas de remoção de biofilmes, particularmente na temperatura ótima de cada enzima em estudo; identificar outras enzimas ou metabólitos produzidos no processo de bioprodução que possivelmente poderiam interferir na remoção de biofilmes; realizar análises de remoção de biofilme com enzima purificada e imobilizada, bem como, comparar a capacidade de remoção com extrato de enzimas comerciais.

Neste contexto, esta pesquisa abre o caminho para novas tecnologias a serem aplicadas no Brasil e que forneçam métodos de prevenção e remoção de biofilmes formado em superfícies, utilizando uma combinação de enzimas hidrolíticas biodegradáveis, agentes de limpeza e sanitizantes.

6 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, L.A.G.; SULAIMAN, N.M.; AROUA, M.K.; NOOR, M.M.M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 65-71, 2007.

ADAPA, V.; RAMYA, L.N.; PULICHERLA, K.K.; RAO, K.R. Cold active pectinases: advancing the food industry to the next generation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2324-2337, 2014.

AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J.B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 6-9, 1981.

ALCÂNTARA, S.R.; SILVA, F.L.H. Influence of spores concentration, moisture, ammonium sulphate concentration and temperature on polygalacturonase production using cashew apple in the solid state fermentation process. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 949-954, 2011.

ALCÂNTARA, S.R.; ALMEIDA, F.A.C.; SILVA, F.L.H. Pectinases production by solid state fermentation with cashew apple bagasse: water activity and influence of nitrogen source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 121-126, 2010.

ALCÂNTARA, S.R.; ALMEIDA, F.A.C.; SILVA, F.L.H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 9, p. 137-142, 2007.

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRO, F. Yeasts: an attractive source of pectinases - from gene expression to potential applications: a review. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1525-1537, 2011.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LAMA, M.J.; SERRA, J.L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21- 28, 1998.

ANDRADE, M.V.V.; DELATORRE, A.B.; LADEIRA, S.A.; MARTINS, M.L.L. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 204-208, 2011.

ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.

ANTHON, G.E.; BARRETT, D.M. Pectin methylesterase activity and other factors affecting pH and titratable acidity in processing tomatoes. **Food Chemistry**, v. 132, p. 915-920, 2012.

ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; GUAGLIANONID. G.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial purification and characterization of pectin methyl esterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4103-4107, 2002.

- ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectin methyl esterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v. 74, p. 133-137, 2001.
- ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Acerola's pectin methyl esterase: studies of heat inactivation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 465-467, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO (ABIA). **Sustentabilidade na indústria da alimentação: uma visão de futuro para a Rio+20**. Brasília: ABIA, 40 p., 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the association of the analytical chemists, 16 ed. Washington, 1995.
- ASTOLFI, A. **Produção de celulases e hemicelulases por fermentação em estado sólido usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais**. 2014, 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.
- AYERS, W.A.; PAPAVIDAS, G.C.; DIEM, A.F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1006-1011, 1966.
- BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes - a review. **Molecules**, v. 19, p. 14821-14842, 2014.
- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BAILEY, M.J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 12, p. 266-271, 1990.
- BEROVIČ, M.; OSTROVERŠNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by soli state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.
- BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, capítulo 13, p. 247-270, 2001.
- BIZ, A. **Produção de pectinases por fermentação no estado sólido para obtenção de ácido D-galacturônico em biorrefinarias**. 2012, 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 1-9, 1999.

BLANDINO, A.; IQBALSYAH, T.; PANDIELLA, S.S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 164–169, 2002.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 497–503, 2001.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98-101, 2007.

BOTELLA, C.; ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 100-106, 2005.

BRASIL, (ANVISA). Resolução RDC nº 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). **Diário Oficial da União**, n. 212, 05 nov. 2010. Seção 1, p. 63-68.

BRASIL, (ANVISA). Resolução nº 26, de 26 de maio de 2009. Aprova lista de enzimas permitidas para o uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do anexo desta Resolução, em substituição ao anexo I da Resolução RDC nº 205 de 14 de novembro de 2006. **Diário Oficial da União**, n. 99, 27 maio 2009. Seção 1, p. 34.

BRASIL. Decreto 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, ano CXLIV, n. 29, 09 fev. 2007. Seção 1, p. 1-9.

BRASIL, (ANVISA). Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o Regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial da União**, n. 222, 17 nov. 2006. Seção 1, p. 65-66.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P.V. Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. **Enzyme Research**, 2011. 10 p.

BURANA-OSOT, J.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHAIDEDGUMJORN, A.; HOSOYAMA, S.; TOIDA, T. Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 461-465, 2010.

BUYUKKILECI, A.O.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Enhanced production of exo-polygalacturonase from agro-based by *Aspergillus sojae*. **Bioresources**, v. 6, n. 3, p. 3452-3468, 2011.

- CAMARGO, L.A.; DENTILLO, D.B.; CARDELLO, L.; GATTÁS, E.A.L. Utilization of orange bagasse in pectinases production by *Aspergillus* sp. **Brasilian Journal of Food and Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 153-156, 2005.
- CANTERI, M.H.G.; MORENO, L.; WOSIACHI, G; SHEER, A.P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149-157, 2012.
- CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (2 Ed.) **Biochemistry & molecular biology of plants**. USA: American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: Couries Companies, Inc., 2000. p. 52-89.
- CARRÉ, B.; BRILLOUET, J.M. Yield and composition of cell wall residues isolated from various feedstuffs used for non-ruminants farm animals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 341-351, 1986.
- CASTILHO, L.R.; MITCHELL, D.A.; FREIRE, D.M.G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5996- 6009, 2009.
- CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.
- CASTILHO, L.R.; ALVES, T.L.M.; MEDRONHO, R.A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 181-186, 1999.
- CECI, L.; LOZANO, J. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. **Food Chemistry**, v. 61, p. 237-241, 1998.
- CHYSIRICHOTE, T.; REIJI, T.; ASAMI, K.; OHTAGUCHI, K. Quantification of the glucosamine content in the filamentous fungus *Monascus ruber* cultured on solid surfaces. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 350-357, 2014.
- COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis: EPUB, 2008. 264 p.
- CORDEIRO, A.L.; WERNER, C. Enzymes for antifouling strategies. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 25, p. 2317-2344, 2011.
- CORONA, A.; SÁEZ, D.; AGOSIN, E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2655-2658, 2005.
- COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

- CROTTI, L.B.; JABOR, V.A.P.; CHELLEGATTI, M.A.S.C.; FONSECA, M.J.V.; SAID, S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 227-235, 1999.
- CSISZÁR, E.; SZAKÁCS, G.; KOCZKA, B. Biopreparation of cotton fabric with enzymes produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1765-1771, 2007.
- DAMÁSIO, A.R.L.; MALLER, A.; SILVA, T.M.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Biotechnological potential of alternative carbon sources for production of pectinases by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 141-148, 2011.
- DANTAS, E.M.; AQUINO, L.C.L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.
- DEL CAÑIZO, A.N.; HOURS, R.A.; MIRANDA M.V.; CASCONI, O. Fractionation of fungal pectic enzymes by immobilized metal ion affinity chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, p. 527-531, 1994.
- DELGADO, L.; TREJO, B.A.; HUITRÓN, C.; AGUILAR, G. Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 515-519, 1992.
- DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.
- DE VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.
- DÍAZ, A.B; ALVARADO, O.; ORY, I.; CARO, I; BLANDINO, A. Valorization of grape pomace and orange peels: improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. **Food and bioproducts processing**, v. 91, n. 4, p. 580-586, 2013.
- DÍAZ, A.B; ORY, I.; CARO, I; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 72-78, 2012.
- DÍAZ, A.B.; CARO I.; ORY, I.; BLANDINO, A. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 302-306, 2007.
- DIETRICH, H.; PATZ, C.; SCHÖPPLAIN, F.; WILL, F. Problems in evaluation and standardization of enzyme preparations. **Fruit Processing**, v. 1, p. 131-134, 1991.

- DINU, D.; NECHIFOR, M.T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 128-137, 2007.
- DIXIT, S.; UPADHYAY, S.K.; SINGH, H.; PANDEY, B.; CHANDRASHEKAR, K.; VERMA, P.C. Pectin methylesterase of *Datura* species, purification, and characterization from *Datura stramonium* and its application. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 100, 2013. 8 p.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113-125, 2003.
- EDWARDS, M.C.; DORAN-PETERSON, J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 565-575, 2012.
- EL-SHEEKH, M.M.; ISMAIL, A-M.S.; EL-ABD, M.A.; HEGAZY, E. M.; EL-DIWANY, A.I. Effective technological pectinases by *Aspergillus carneus* NRC1 utilizing the egyptian orange juice industry scraps. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 12-18, 2009.
- EMBABY, A.M.; MASOUD, A.A.; MAREY, H.S.; SHABAN, N.Z.; GHONAIM, T.M. Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from *Bacillus licheniformis* SHG10. **Springer Plus**, v. 3, n. 327, 2014. 13 p.
- ESAWY, M.A., GAMAL, A.A.; KAMEL, Z.; ISAMAIL, A-M.S.; ABDEL-FATTAH, A.F. Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1463-1469, 2013.
- FADEL, M. High-level xylanase production from sorghum flour by a newly isolate of *Trichoderma harzianum* cultivated under solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 51, p. 61-78, 2001.
- FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 223-227, 2003.
- FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.
- FERREIRA, J.A.; LENNARTSSON, P.R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.
- FERREIRA, V.; SILVA, R.; SILVA, D.; GOMES, E. Production of pectate lyase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state and submerged fermentation. **International Journal of Microbiology**, 2010. 14 p.

FLACH, J. **Caracterização e controle de biofilmes formados por bactérias pesicrotróficas isoladas de resfriadores de expansão para leite**. 2015, 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

FLACH, J.; GRZYBOWSKI, V.; TONIAZZO, G.; CORCÃO, G. Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 571-576, 2014.

FONTANA, R.C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M.M. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 371-377, 2005.

FREITAS, P.M. **Produção de poligalacturonase termoestável pelo fungo *Rhizomucor pusillus* A 13.36 em fermentação em estado sólido, purificação e caracterização da enzima**. 2009, 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

FREITAS, P.M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; SILVA, R.; GOMES, E. Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *Monascus sp* N8 and by thermotolerant *Aspergillus sp* N12 on solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 302-306, 2006.

FREIRE, D.M.G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996, 185 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

GÀMEZ, O.R.; DÍAZ, M.S. Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades. **Tecnología Química**, v. 28, p. 80-90, 2008.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GLINKA, E.M.; LIAO, Y. Purification and partial characterisation of pectin methylesterase produced by *Fusarium asiaticum*. **Fungal biology**, v. 115, p. 1112-1121, 2011.

GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 281-287, 2011.

GOMES, J. **Produção de poligalacturonase por fermentação submersa utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio sintético**. 2010, 53 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.

GONÇALVES, D.B.; TEIXEIRA, J.A.; BAZZOLLI, D.M.S.; QUEIROZ, M.V.; ARAÚJO, E.F. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 140-146, 2012.

GONZALEZ, S.L.; ROSSO, N.D. Determination of pectin methylesterase activity in commercial pectinases and study of the inactivation kinetics through two potentiometric procedures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 412-417, 2011.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition animal feed. **Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

GUMMADI, S.N.; KUMAR, S; ANEESH, C.N.A. Effect of salts on growth and pectinase production by hylotolerant yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. **Current Microbiology**, v. 54, p. 472-476, 2007.

GUMMADI, S.N.; KUMAR, D.S. Microbial pectic transeliminases. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 451-458, 2005.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; LARSSON, C.U.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GÖRGENS, J.; ZYL, W.H. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 31, 2005.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HAMDY, H.S. Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. **Annals of microbiology**, v. 55, n. 3, p. 205-211, 2005.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S.A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 265-272, 2004.

HEERD, D.; TARI, C.; FERNÁNDEZ-LAHOIRE. Microbial strain improvement for enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus sojae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7471-7481, 2014a.

HEERD, D.; DIERCKS-HORN, S.; FERNÁNDEZ-LAHOIRE, M. Efficient polygalacturonase production from agricultural and agro-industrial residues by solid-state culture of *Aspergillus sojae* under optimized conditions. **Springerplus**, v. 3, n. 742, 2014b. 14 p.

HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHOIRE, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: a comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 102-110, 2012.

HENDGES, D.H.; MONTANARI, Q.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Production and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid-state fermentation in double-surface bioreactor. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 54, n. 2, p. 253-258, 2011.

HENDGES, D.H. **Produção de poligalactunonases por *Aspergillus niger* em processo em estado sólido em biorreator com dupla superfície**. 2006, 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, capítulo 13, p. 94, 2001.

HO, V.T.; ZHAO, J.; FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 72-87, 2014.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HOONDAL, G.S.; TIWARI, R.P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 409-418, 2002.

HOUDT, R. van; MICHELIS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117-1131, 2010.

HULTIN, H.O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. **Journal of Food Science**, v. 31, n. 3, p. 320-327, 1966.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 1-81, 2015.

IGLESIAS, M.T.; LOZANO, J.E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 215-223, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, 1028 p.

IRSHAD, M.; ASGHER, M.; ANWAR, Z.; AHMAD, A. Biotechnological valorization of pectinolytics and their industrial applications: a review. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 11, p. 1649-1654, 2014.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

- JEGANNATHAN, K.R.; NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.
- JOLIE, R.P.; DUVETTER, T.; LOEY, A.M.V.; HENDRICKX, M.E. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2583-2595, 2010.
- JOHANSEN, C.; FALHOLT, P.; GRAM, L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3724-3728, 1997.
- JOSHI, V.K; PARMAR, M.; RANA, N. Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. **Indian Journal Natural Products and Resources**, v. 2, p. 189-197, 2011.
- KAPOOR, M.; KUHAD, R.C. Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 317-322, 2002.
- KASHYAP, D.R.; SONI, S.K; TEWARI, R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 251-254, 2003.
- KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.
- KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 239-243, 2004.
- KHAIRNAR, Y.; KRISHNA K., VAMSI; BORASTE, A.; GUPTA, N.; TRIVEDI, S.; PATIL, P.; GUPTA, G.; GUPTA, M.; JHADAV, A.; MUJAPARA, A.; JOSHI B.; MISHRA D. Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 13-17, 2009.
- KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 21-34, 2013.
- KOPECNY, J.; HODROVÁ, B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. **Letters of Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 312-316, 1995.
- KOSER, S.; ANWAR, Z.; IQBAL, Z.; ANJUM, A.; AQIL,T.; MEHMOOD, S.; IRSHAD, M. Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 327-332, 2014.

KUIVANEN, J.; DANTAS, H.; MOJZITA, D.; MALLMANN, E.; BIZ, A.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.; RICHARD, P. Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *Aspergillus niger*. **AMB Express**, v. 4, n. 33, 2014, 8 p.

KUMAR, Y.S.; VARAKUMAR, S.; REDDY, O.V.S. Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.) peel using *Fusarium moniliforme* in solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1973-1980, 2010.

KUMAR, D.; JAIN, V.K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1731-1738, 2003.

LADEIRA, R.I.S. **Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase de *Cylindrocladium pteridis***. 2013, 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

LANDBO, A.K.; KAACK, K.; MEYER, A.S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 135-142, 2007.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

LARA-MÁRQUEZ, A.; ZAVALA-PÁRAMO, M.G. LÓPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO, H.C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 859-868, 2011.

LEROUX, J.; LANGENDORFF, V.; SCHICK, G.; VAISHNAV, V.; MAZOYER J. Emulsion stabilizing properties of pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 455-462, 2003.

LEIJDEKKERS, A.G.M.; BINK, J.P.M.; GEUTJES, S.; SCHOLS, H.A.; GRUPPEN, H. Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose; a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 518-525, 2013.

LEQUETTE, Y.; BOELS, G.; CLARISSE, M.; FAILLE, C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. **Biofouling**, v. 26, n. 4, p. 421-431, 2010.

LI, Z.; BAI, Z.; ZHANG, B.; LI, B.; JIN, B.; ZHANG, M.; LIN, F.; ZHANG, H. Purification and characterization of alkaline pectin lyase from a newly isolated *Bacillus clausii* and its application in elicitation of plant disease resistance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 2241-2256, 2012.

- LU, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 392-397, 1997.
- MALLER, A.; DAMÁSIO, A.R.L.; SILVA, T.M.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niger*. **Enzyme Research**, 2011. 6 p.
- MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 693-702, 2004.
- MANN, E.E.; WOZNIAK, D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 893-916, 2012.
- MARCATO-ROMAIN, C.E.; PECHAUD, Y.; PAUL, E.; GIRBAL-NEUHAUSER, E.; DOSSAT-LÉTISSE, V. Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. **Biofouling**, v. 28, n. 3, p. 305-314, 2012.
- MARTIN, N.; SOUZA, S.R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 813-819, 2004.
- MARTÍNEZ-TRUJILLO, A.; ARREGUÍN-RANGEL, L.; GARCÍA-RIVEIRO, M.; AGUILAR-OSRIO, G. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 202-209, 2011.
- MARTINS, E.S.; LEITE, R.S.R.; SILVA, R.; GOMES, E. Purification and properties of polygalacturonase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on solid-state fermentation. **Enzyme Research**, 2013.
- MARTINS, E.S.; SILVA, D.; SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.
- MARTOS, M.A.; ZUBRESKI, E.R.; GARRO, O.A.; HOURS, R.A. Production of pectinolytic enzymes by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* isolated from citrus fruits peels. **Biotechnology Research International**, 2013. 7 p.
- MASÁK, J.; ČEJKOVÁ, A.; SCHREIBEROVÁ, O.; REZANKA, T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. **FEMS Microbiology Ecology**, v.89, n. 1, p.1-14, 2014.
- MATA-GÓMEZ, M.A.; HEERD, D.; OYANGUREN-GARCÍA, I.; BARBERO, F.; RITO-PALOMARES, M.; FERNÁNDEZ-LAHORE, M. A novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235 mutants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1554-1561, 2014.

MATSUMOTO, T.; MORIYA, M.; SAKURAI, M.H., KIYOHARA, H.; TABUCHI, Y.; YAMADA, H. Stimulatory effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L., on G-CSF secretion from intestinal epithelial cells. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 581-588, 2008.

MENEZES, G.D.G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna**. 2006, 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Seropédica, 2006.

MEERVENNE, E. van; DE WEIRDT, R.; VAN COILLIE, E.; DEVLIEGHIERE F, HERMAN L, BOON N. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 332-338, 2014.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R.C.; SOARES-RAMOS, J.R.L.; COELHO, J.L.C.; SILVA, D.O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 246-250, 1998.

MOLNÁR, E.; ESZTERLE, M.; KISS, K.; NEMESTÓTHY, N.; FEKETE, J.; BÉLAFI-BAKO, K. Utilization of electrodialysis for galacturonic acid recovery. **Desalination**, v. 241, p. 81-85, 2009.

MOHAMMADI, M.; ZAMANI, A.; KARIMI, K. Effect of phosphate on glucosamine production by ethanolic fungus *Mucor indicus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 6, p. 1465-1472, 2013.

MOHAMED, S. A.; AL-MALKI, A. L.; KHAN, J.A. ; KABLI, S.A.; AL-GARNI, S.M. Solid State Production of Polygalacturonase and Xylanase by *Trichoderma* Species Using Cantaloupe and Watermelon Rinds. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 605-611, 2013.

MOHAMED, S. A.; AL-MALKI, A. L.; KUMOSANI T. A. Characterization of a polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* grown on citrus peel with application for apple juice. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, p. 2770-2777, 2009.

MUNARIN, F.; TANZI, M.C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 681-689, 2012.

MURAD, H.A; AZZAZ, H.H. Microbial pectinases and ruminant nutrition. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 246-269, 2011.

MURTHY, P.S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-a review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012.

NC-IUBMB. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 01/05/2015.

NIELSEN, J.E.; CHRISTENSEN, T.M.I.E. Distribution of pectin methyl esterase and acetyl esterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography. **Plant Science**, v. 162, p. 799-807, 2002.

NIGHOJKAR, S.; PHANSE, Y.; SINHA, D., NIGHOJKAR, A.; KUMAR, A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1136-1140, 2006.

OBEROI, H.S.; SANDHU, S.K.; VADLANI, P.V. Statistical optimization of hydrolysis process for banana peels using cellulolytic and pectinolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 257-265, 2012.

OLIVEIRA, A.C. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica* L.)**. 2013, 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

OLIVEIRA, F.C.; DIAS, M.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 633-638, 2007.

OORT, M. van. Enzymes in food technology, introduction. In: WHITEHURST R.J; OORT, M. van. **Enzymes in Food Technology**. 2. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, capítulo 1, p. 1-16, 2010.

ORGAZ, B; KIVES, J.; PEDREGOSA, A.M.; MONISTROL, I.F.; LABORDA, F.; SANJOSE, C. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 51-56, 2006.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209-217, 2004.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, v. 127, p. 623-631, 2011.

OULAHAL-LAGSIR, O.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M.; BLUM, L.J. “*Escherichia coli*-milk” biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes. **Biofouling**, v. 19, p. 159-168, 2003.

PANCHEV, I.N.; SALVOV, A.; NIKOLOVA, K.; KOVACHEVA, D. On the water-sorption properties of pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 763-769, 2010.

- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MICHELL, D. New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PANDEY, A.; SELVA KUMAR C.R; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A. Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 37, p. 169-172, 1991.
- PATIL, S.R.; DAYANAND A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2054–2058, 2006.
- PAULSEN, B.S.; BARSETT, H. Bioactive pectic polysaccharides. **Advances in Polymer Science**, v. 186, p. 69-101, 2005.
- PEDROLI, D.B.; CARMONA, E.C. Purification and characterization of a unique pectin lyase from *Aspergillus giganteus* able to release unsaturated monogalacturonat during pectin degradation. **Enzyme Research**, 2014.
- PEDROLI, D.B.; MONTEIRO, A.C.; GOMES, E.; CARMONA, E.C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial. Application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 9-18, 2009.
- PEDROLI, D.B. **Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de *Aspergillus giganteus***. 2008, 80 f. Mestre Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.
- PEREZ, E.E.; FERNÁNDEZ, M.B.; NOLASCO, S.M.; CRAPISTE, G.H. Effect of pectinase on the oil solvent extraction from different genotypes of sunflower (*Helianthus annuus L.*). **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 393-398, 2013.
- PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A.S. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 259-265, 2010.
- PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 5 p.
- PITT, D. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 350-354, 1988.

POLETTTO, P. **Produção, recuperação e avaliação de pectinases obtidas de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo.** 2015, 124 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

POLIDORO, T.A. **Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada.** 2009, 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

PRADE, R.; ZHAN, D.; AYOUBI, P.; MORT, A. Pectins, pectinases, and plant-microbe interactions. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 361-389, 1999.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998, 15 p.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.

RALET, M.C.; THIBAUT, J.F.; DELLA VALLE, G.D. Influence of extrusion-cooking on the physico-chemical properties of wheat bran. **Journal of Cereal Science**, v.11, n. 3, p. 249-259, 1990.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products.** New Delhi: Tata McGraw Hill Publishing Company, 1979, 634 p.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Research International**, 2015. 17 p.

REN, C.; KERMONDE, A.R. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. **Plant Physiology**, v. 124, n. 1, p. 231-242, 2000.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597-604, 2009.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 929-967, 2001.

ROCHA, N.R.A.F.; BARROS, M.A.; FISCHER, J.; FILHO, U.C.F.; CARDOSO, V.L. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. **Renewable Energy**, v. 57, p. 432-435, 2013.

RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, D.E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; CARVALHO, J.C.; KARP, S.G.; PARADA, J.L.; SOCCOL, C.R. Process development to recover pectinases produced by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocess & Biotechniques**, v.2, n.4, 2012, 7 p.

RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, D.E.; RODRÍGUEZ LEÓN, J.A.; CARVALHO, J.C.; STURM, W.; SOCCOL, C.R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10657-10662, 2011.

RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, D.E.R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. 2009, 125 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba, 2009.

RODRÍGUEZ-NOGALES, J.M.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. **Food Chemistry**, v.101, p. 634-642, 2007.

ROMEY, A.A.; MEKKY, T.M.; RAMADAN; R.A.; HENDAWI, M.Y. Dissipation of profenofos, imidacloprid and penconazole in tomato fruits and products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 6, p. 812-817, 2009.

ROSA, C. **Diversificação nos cultivos de citros para consumo *in natura*: o exemplo adotado em uma pequena propriedade rural no município de Erechim-RS**. 2010, 54 f. Monografia de Especialização (MBA em Gestão em Agronegócio) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2010.

ROSSI, S.C. **Produção de aromas frutais por *Ceratocystis fimbriata* cultivado em polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana por fermentação no estado sólido: determinação da atividade de pectinase (poligalaturonase), esterases e lipase**. 2011, 80 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RUIZ, H.A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R.M.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; AGUILAR, C.N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90-95, 2012.

SANDRI, I.G.; FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Influence of pH and temperature on the production of poligalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, 430-436, 2015.

SANDRI, I.G.; LORENZONI, C.M.T.; FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 469-475, 2013.

SANDRI, I.G.; FONTANA; R.C.; BARFKNECHT, D.M.; SILVEIRA, M.M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2217-2222, 2011.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. 2005, 90 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SANTIN, M.M; TREICHEL, H.; VALDUGA, E.; CABRAL, L.M.C; Di LUCCIO, M. Evaluation of enzymatic treatment of peach juice using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 3, p. 507-512, 2008.

SANTOS, S.F.M.; SOUZA, R.L.A.; ALCÂNTARA, S.R.; PINTO, G.A.S.; SILVA, F.L.H.; MACEDO, G.R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 10, p. 101-109, 2008.

SANTOS, S.F. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007, 151 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SCHOLS, H.A.; VELD, P.H.; DEELEN, W.; VORAGEN, A.G.J. The effect of the manufacturing method on the characteristics of apple juice. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 192, p. 142-148, 1991.

SCHULTZ, A.K.; ANTHON, G.E; DUNGAN, S.R; BARRETT, D.M. Effect of pectin methylesterase on carrot (*Daucus carota*) juice cloud stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1111-1118, 2014.

SCOTTI, C.T.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2001.

SILVA, D.; MARTINS, E.S.; LEITE, R.S.R.; SILVA, R.; FERREIRA, V.; GOMES, E. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1237-1243, 2007.

SILVA, E.G; BORGES, M.F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859-865, 2005a.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005b.

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. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2002.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SINGH, S.A.; RAMAKRISHNA, M.; APPU RAO, A.G. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 411-417, 1999.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOCCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Potential of solid-state fermentation for production of l(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 286-290, 1994.

SOLÍS, S.; LOEZA, J.; SEGURA, G; TELLO, J.; REYES, N.; LAPPE, P.; GUITÉRREZ, L.; RÍOS, F.; HUITRÓN, C. Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 123-128, 2009.

SORIANO, M.; DIAZ, P.; PASTOR F.I.J. Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. **Current Microbiology**, v. 50, p. 114-118, 2005.

SOUSA, C.A.B.; SILVA, F.L.H.; CONRADO, L.S. Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 7, p. 790-794, 2012.

SOUZA, R.L.A.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H.; AMORIM, B.C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 987-992, 2010.

SOUZA, J.V.B., SILVA, T.M., MAIA, M.L.S., TEIXEIRA, M.F.S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus*. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 455-458, 2003.

SPELBRINK, R.E.J.; GIUSEPPIN, M.L.F. Large-scale single step partial purification of potato pectin methylesterase that enables the use in major food applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 1998-2006, 2014.

STEUDLER, S.; BLEY, T. Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 7, p. 1313-1323, 2015.

STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**. 2013, 106 f. Dissertação (Mestrado em Química - Ciências Exatas) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Curitiba, 2013.

- TARAGANO, V.M.; PILOSO, A.M.R. Application of doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 25, p. 411-419, 1999.
- TARI, C.; DOGAN, N.; GOGUS, N. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 824-829, 2008.
- TARI, C.; GÖGUS, N.; TOKATLI, F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1108-1116, 2007.
- TEIXEIRA, C.B.; MACEDO, G.A.; MACEDO, J.; SILVA, L.H.M.; RODRIGUES, A.M.C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.
- TEIXEIRA, J.A.; GONÇALVES, D.B.; QUEIROZ, M.V.; ARAUJO, E.F. Improved pectinase production in *Penicillium griseoroseum* recombinant strains. **Journal Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 818-825, 2011.
- THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.
- TOMLIN, B.D.; JONES, S.E.; REYES-DE-CORCUERA, J.I. High hydrostatic pressure protection of a pectinase cocktail against thermal inactivation. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 674-680, 2013.
- TORRES, C.E.; LENON, G.; CRAPERI, D.; WILTING, R.; BLANCO, A. Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 95-103, 2011.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.
- ÜNAL, M.Ü.; ŞENER, A. Extraction and characterization of pectin methylesterase from *Alyanak apricot* (*Prunus armeniaca* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 1194-1199, 2015
- UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por micro-organismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. 2003, 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-395, 2007.

- UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley & Sons, 1998, 454 p.
- USTOK, F.I.; TARI, C.; GOGUSB, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 322-334, 2007.
- VALADÃO, R.C. **Estudo da fermentação semi-sólida de uma linhagem selecionada de *Aspergillus niger* na produção de inulinase**. 2005, 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.M. Solid state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.
- VASU, P.; SAVARY, B.J.; CAMERON, R.G. Purification and characterization of a papaya (*Carica papaya* L.) pectin methylesterase isolated from a commercial papain preparation. **Food Chemistry**, v. 133, p. 366-372, 2012.
- XU, S.X.; QIN, X.; LIU, B.; ZHANG, D.Q.; ZHANG, W.; WU, K.; ZHANG, Y.H. An acidic pectin lyase from *Aspergillus niger* with favourable efficiency in fruit juice clarification. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 181-187, 2014.
- WANG, L.; YANG, S.T. Solid state fermentation and its applications. In: YANG, S-T, **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**. London: Elsevier Science, capítulo 18, p. 465-489, 2007.
- WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P.; MIKKELSEN, D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Journal of Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.
- WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P., Pectin: cell biology for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 9-27, 2001.
- WINKELSTRÖTER, L.K.; TEIXEIRA, F.B.; SILVA, E.P.; ALVES, V.F.; De MARTINIS, E.C. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 35-46, 2014.
- YADAV, S.; DUBEY, A.K.; ANAND, G.; YADAV, D. Characterization of a neutral pectin lyase produced by *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 in solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 713-720, 2012.
- YADAV, S.; YADAV, P.K.; YADAV, D.; YADAV, K.D.S. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1-10, 2009a.
- YADAV, S.; YADAV, P.K.; YADAV, D.; YADAV, K.D.S. Purification and characterization of pectin lyase produced by *Aspergillus terricola* and its application in retting of natural fibers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 270-283, 2009b.

- ZAMANI, A.; JEIHANIPOUR, A.; EDEBO, L.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8314-8318, 2008.
- ZANAROLI, G.; NEGRONI, A.; CALISTI, C.; RUZZI, M.; FAVA, F. Selection of commercial hydrolytic enzymes with potential antifouling activity in marine environments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 574- 579, 2011.
- ZENI, J.; GOMES, J.; AMBROSZINI, E.; BASSO, A.P.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E. Experimental design applied to the optimization and partial characterization of pectin Liase from a newly isolated *Penicillium brasilianum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 908-915, 2014.
- ZENI, J.; GOMES, J.; AMBROSZINI, E.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D. VALDUGA, E. Experimental design applied to the optimization and partial characterization of pectin-methyl-esterase from a newly isolated *Penicillium brasilianum*. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 40, p. 5886-5896, 2013.
- ZENI, J.; CENCE, K.; GRANDO, C.E; TIGGERMAN, L.; COLET, R.; LERIN, L.; CANSIAN, R.L.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Screening of pectinase-producing microorganism with polygalacturonase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnonology**, v. 163, p. 383-392, 2011.
- ZHANG, H.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Influence of pectinase treatment on fruit spirits from apple mash, juice and pomace. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1909-1913, 2011.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 825-830, 2000.
- ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 96-102, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados do Planejamento Experimental: Processo de Extração da exo-PG, PME e PMGL

Tabela 17: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da exo-PG.

	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média*	9,62	0,144	66,66	0,0002
(X_1) Temperatura(L)	-0,146	0,068	-2,15	0,1643
Temperatura (Q)*	-0,773	0,075	-10,35	0,0092
(X_2) Tempo(L)	0,114	0,068	1,68	0,2348
Tempo (Q)	-0,293	0,075	-3,91	0,0595
(X_3) Agitação (L)*	0,350	0,068	5,15	0,0357
Agitação (Q)	-0,303	0,075	-4,05	0,0558
$X_1L.X_2L$	-0,368	0,089	-4,15	0,0534
$X_1L.X_3L$	0,352	0,089	3,97	0,0579
$X_2L.X_3L$	-0,098	0,089	-1,10	0,3848

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

Tabela 18: Análise de variância para a extração da exo-PG do planejamento fatorial completo 2^3 .

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	$F_{calculado}$
Regressão	6,95	2	3,48	6,73
Resíduo	7,23	14	0,52	
Falta de Ajuste	7,10	12		
Erro Puro	0,125	2		
Total	14,18	16		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação = 0,88; $F_{2;14;0,05} = 3,74$.

Tabela 19: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da PME.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	6,36	0,096	66,27	0,0002
(X ₁)Temperatura(L)*	0,396	0,045	8,771	0,0127
Temperatura (Q)*	-0,367	0,050	-7,375	0,0179
(X ₂)Tempo(L)*	0,276	0,045	6,118	0,0257
Tempo (Q)	-0,145	0,050	-2,920	0,1000
(X ₃)Agitação (L)	-0,020	0,045	-0,433	0,7071
Agitação (Q)	-0,130	0,050	-2,623	0,1197
X ₁ L.X ₂ L	0,167	0,059	2,828	0,1056
X ₁ L.X ₃ L	-0,250	0,059	-4,243	0,0513
X ₂ L.X ₃ L	0,125	0,059	2,121	0,1679

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

Tabela 20: Análise de variância para a extração da PME do planejamento fatorial completo 2^3 .

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F_{calculado}
Regressão	4,38	3	1,46	5,61
Resíduo	3,38	13	0,26	
Falta de Ajuste	3,32	11		
Erro Puro	0,055	2		
Total	7,75	16		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação = 0,84; $F_{3;13;0,05} = 3,41$.

Tabela 21: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2^3 para a extração da PMGL.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média*	41,58	0,485	85,69	0,0001
(X ₁)Temperatura(L)	-0,805	0,228	-3,53	0,0717
Temperatura (Q)*	-4,91	0,251	-19,56	0,0026
(X ₂)Tempo(L)	-0,532	0,228	-2,33	0,1447
Tempo (Q)*	2,87	0,251	11,44	0,0076
(X ₃)Agitação (L)*	1,89	0,228	8,28	0,0143
Agitação (Q)	0,563	0,251	2,24	0,1544
X ₁ L.X ₂ L	1,21	0,298	4,06	0,0557
X ₁ L.X ₃ L	0,791	0,298	2,66	0,1172
X ₂ L.X ₃ L	-0,821	0,298	-2,76	0,1102

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)**Tabela 22:** Análise de variância para a extração da PMGL do planejamento fatorial completo 2^3 .

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	$F_{calculado}$
Regressão	559,95	3	186,65	19,15
Resíduo	126,72	13	9,75	
Falta de Ajuste	125,30	11	11,39	
Erro Puro	1,42	2	0,71	
Total	686,67	16		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação = 0,90; $F_{3;13;0,05} = 3,41$.

APÊNDICE B – Resultados do Planejamento Experimental: Produção da exo-PG, PME e PMGL

Tabela 23: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2² para atividade de exo-PG.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t (2)	P
Média*	20,10	0,137	146,29	0,0001
(X ₂) Farelo de Trigo (L) *	1,94	0,084	23,07	0,0019
Farelo de Trigo (Q) *	-1,80	0,101	-17,89	0,0031
(X ₃) AMM (L) *	-2,39	0,084	-28,37	0,0012
AMM (Q) *	-3,31	0,101	-32,95	0,0009
X ₂ L.X ₃ L*	1,31	0,119	11,00	0,0082

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

Tabela 24: Análise de variância para a bioprodução de exo-PG do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F_{calculado}
Regressão	148,29	5	29,66	14,73
Resíduo	10,07	5	2,01	
Falta de Ajuste	9,96	3	3,32	
Erro Puro	0,113	2	0,056	
Total	158,36	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Total = Regressão + Resíduo; Coeficiente de Correlação = 0,97; F_{5;5;0,05} = 5,05.

Tabela 25: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2³ para atividade de pectina metilesterase (PME).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	8,05	0,192	41,94	0,0006
(X ₁) Casca de Laranja (L) *	-1,58	0,090	-17,48	0,0032
Casca de Laranja (g) (Q)	-0,361	0,099	-3,64	0,0681
(X ₂) Farelo de Trigo (L) *	-0,473	0,090	-5,24	0,0345
Farelo de Trigo (Q)	-0,421	0,099	-4,23	0,0516
(X ₃) AMM (L)	0,236	0,090	2,62	0,1199
AMM (Q)	-0,361	0,099	-3,64	0,0681
X ₁ L.X ₂ L*	1,08	0,118	9,19	0,0116
X ₁ L.X ₃ L	-0,417	0,118	-3,54	0,0715
X ₂ L.X ₃ L	-0,250	0,118	-2,12	0,1679

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

Tabela 26: Análise de variância para a bioprodução de PME do planejamento fatorial completo 2^3 .

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	$F_{calculado}$
Regressão	46,38	3	15,46	21,36
Resíduo	9,41	13	0,724	
Falta de Ajuste	9,19	11		
Erro Puro	0,222	2		
Total	55,79	16		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Total = Regressão + Resíduo; Coeficiente de Correlação = 0,91; $F_{3;13;0,05} = 3,41$.

Tabela 27: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de pectina liase (PMGL).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média*	57,35	0,419	136,76	0,0001
(X ₁) Casca de Laranja (L) *	-4,29	0,197	-21,81	0,0021
Casca de Laranja (g) (Q)*	-4,88	0,217	-22,47	0,0019
(X ₂) Farelo de Trigo (L) *	-6,00	0,197	-30,47	0,0011
Farelo de Trigo (Q)	0,367	0,217	1,69	0,2333
(X ₃) AMM (L) *	11,18	0,197	56,76	0,0003
AMM (Q) *	-4,41	0,217	-20,32	0,0024
X ₁ L.X ₂ L*	1,59	0,257	6,19	0,0251
X ₁ LX ₃ L	-0,020	0,257	-0,077	0,9458
X ₂ L.X ₃ L	-0,534	0,257	-2,07	0,1738

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

Tabela 28: Análise de variância para a bioprodução de PMGL do planejamento fatorial completo 2^3 .

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	$F_{calculado}$
Regressão	2925,69	6	487,61	3,79
Resíduo	1287,12	10	128,71	
Falta de Ajuste	1286,06	8		
Erro Puro	1,06	2		
Total	4212,81	16		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Total = Regressão + Resíduo; Coeficiente de Correlação = 0,83; $F_{6;10;0,05} = 3,21$.

APÊNDICE C – Resultados do Planejamento Experimental: Temperatura e pH ótimo de reação da exo-PG, PME e PMGL

Tabela 29: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de poligalacturonase (exo-PG) em função de temperatura e pH.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	26,03	0,177	147,35	0,0001
(X ₁) pH (L) *	5,90	0,108	54,41	0,0003
pH (Q)*	-6,65	0,129	-51,44	0,0004
(X ₂) Temperatura (L)*	-2,73	0,108	-25,16	0,0016
Temperatura (Q)*	-6,08	0,129	-47,02	0,0005
X ₁ L.X ₂ L*	-2,17	0,153	-14,17	0,0049

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

Tabela 30: Análise de variância para caracterização da exo-PG do planejamento fatorial completo 2^3 .

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F_{calculado}
Regressão	708,06	5	141,61	17,91
Resíduo	39,53	5	7,91	
Falta de Ajuste	39,34	3		
Erro Puro	0,187	2		
Total	747,59	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Total = Regressão + Resíduo; Coeficiente de Correlação = 0,97; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Tabela 31: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de pectina metilesterase (PME) em função do pH e temperatura.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	21,11	0,294	71,80	0,0002
(X ₁) pH (L) *	20,68	0,180	114,73	0,0001
pH (Q) *	6,69	0,215	31,10	0,0010
(X ₂) Temperatura (L) *	1,70	0,180	9,43	0,0111
Temperatura (Q)	0,353	0,215	1,64	0,2423
X ₁ L.X ₂ L*	2,46	0,255	9,66	0,0106

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

Tabela 32: Análise de variância para a caracterização da PME do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F _{calculado}
Regressão	3725,31	4	931,33	55,95
Resíduo	99,87	6	16,65	
Falta de Ajuste	99,354	4	24,838	
Erro Puro	0,519	2	0,259	
Total	3825,181	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Total = Regressão + Resíduo; Coeficiente de Correlação = 0,99; F_{4;6;0,05} = 4,53

Tabela 33: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo 2² para atividade de pectina liase (PMGL).

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média*	92,40	0,706	130,78	0,0001
(X ₁) pH (L)	6,18	0,433	14,27	0,0049
pH (Q)*	-3,81	0,517	-7,38	0,0179
(X ₂) Temperatura (L)	0,158	0,433	0,365	0,7501
Temperatura (Q)*	-18,65	0,517	-36,07	0,0008
X ₁ L.X ₂ L*	5,72	0,612	9,35	0,0112

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 34: Análise de variância para a bioprodução da PMGL do planejamento fatorial completo 2³.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F _{calculado}
Regressão	2400,03	4	600,01	5,51
Resíduo	652,96	6	108,83	
Falta de Ajuste	649,96	4	162,49	
Erro Puro	2,99	2	1,50	
Total	3052,99	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro puro; Total = Regressão + Resíduo; Coeficiente de Correlação = 0,88; F_{4;6;0,05} = 4,53

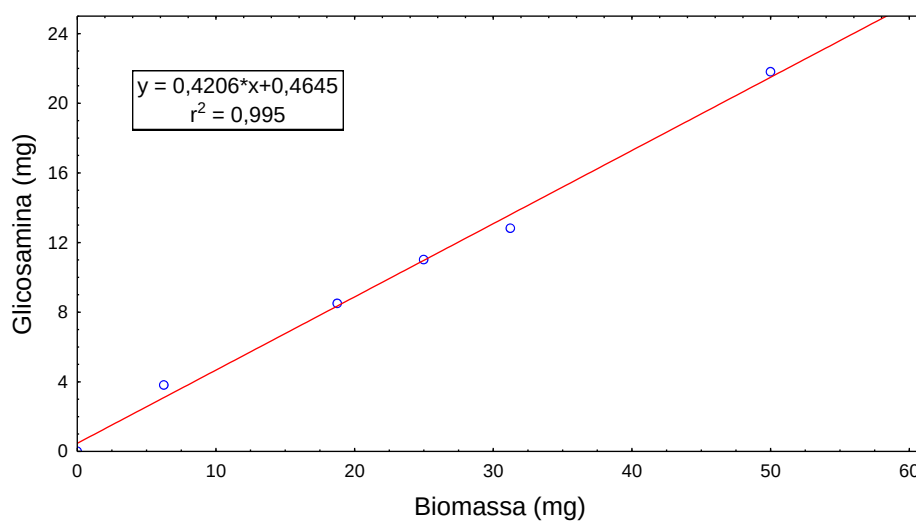
APÊNDICE D – Sistema de quantificação de biomassa pelo método de N-acetilglicosamina

Figura 27: Correlação entre o teor de glicosamina (mg) e biomassa seca (mg) de *Aspergillus niger* ATCC 9642 cultivado em meio líquido.