

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE
Aspergillus niger ATCC 9642 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

JONAINA PILI

ERECHIM, RS - BRASIL.

Novembro, 2014.

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE
Aspergillus niger ATCC 9642 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

JONAINA PILI

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

ERECHIM, RS - BRASIL.

Novembro, 2014.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Jonaina Pili

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

Comissão Julgadora:

Prof^a. Eunice Valduga, D. Sc
Orientadora

Prof^a. Geciane Toniazzi, D. Sc.
Orientadora

Prof^a. Alice Teresa Valduga, D. Sc
URI – Erechim - RS

Prof^a. Jamile Zeni, D. Sc
URI – Erechim - RS

Prof^a. Anieli Pinto Kempka , D. Sc
UDESC – Pinhalzinho – SC

Prof^a. Raquel Cristine Kuhn, D. Sc
UFMS – Santa Maria RS

Erechim, novembro de 2014.

AGRADECIMENTO

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio, de diversas formas, de pessoas e instituições que acreditaram no potencial desta pesquisa.

Gostaria de primeiramente agradecer a URI por todo carinho e apoio nos dados em todos estes anos de aprendizado, e quando digo aprendizado não me refiro somente a parte intelectual, mas uma evolução como ser humano, obrigada por tudo.

Às agências de fomento que financiam o projeto e fornecem as bolsas de estudo e iniciação científica: CAPES, CNPq e FAPERGS.

As minhas amigas e orientadoras Profa. Dra. Eunice Valduga e a Profa. Dra. Geciane Toniazzi, pela disponibilidade de avaliação deste trabalho e pelas importantes colaborações, por exigir mais de mim e colocar-me de volta ao caminho certo todas as vezes que precisei; por mostrar que sempre há um caminho; pelos momentos de descontração, cheios de boas risadas; pela troca de idéias e por argumentações que nunca terminam, e nos fazem querer sempre mais, com certeza tive uma das melhores equipes de pesquisa, onde fica claro que ninguém faz pesquisa sozinha.

Que equipe maravilhosa que eu tive nestes anos, as bolsistas que trabalharam comigo hoje são grandes amigas: Rosicler, Karine, Lúcia, Ellin, Luana, Tainara, Patricia, Ana, Jamile...meu muito obrigada, e as colegas maravilhosas que tive, que mesmo não sendo do mesmo projeto, me tiravam dúvidas, me ensinavam no que eu não sabia ou desconhecia, ser colega, ser amigo é privilégio de poucos, meu muito obrigada por todo companheirismo.

E do que adianta uma vida de oportunidades, se não tivermos nossa família junto da gente, obrigada meu Deus por ter me dado uma família maravilhosa, em especial a minha mãe, meu exemplo. Ao meu irmão e minha cunhada que me deram o sobrinho mais encantador do mundo. Ao meu marido Giovani, que sempre me proporciona sonhar, acreditar em meus sonhos. A família Pili que sempre me motivou. Cheguei até aqui junto com vocês.

Amo todos vocês por estarem junto comigo sempre.

Resumo da Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Jonaina Pili

Orientadores: Eunice Valduga e Geciane Toniazzo

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioprodução de pectinases (pectina liase - PMGL, pectato liase - PGL, pectinaesterase - PE, pectinametilesterase - PME e exopoligalacturonase - exo-PG) por *Aspergillus niger* ATCC 9642, em fermentação submersa, empregando meio complexo e composto por resíduos agroindustriais (casca de laranja, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz), bem como a caracterização parcial dos extratos brutos obtidos. Inicialmente para o *screening* de variáveis da bioprodução empregou-se um planejamento do tipo Plackett-Burman seguido de planejamentos fatoriais completos, fixando as variáveis agitação (180 rpm), temperatura (30°C) e pH_{inicial} (5,5). A máxima produção de PMGL foi de 21,24 U/mL em meio composto por 32 g/L de pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura e 0,04 g/L de sulfato de ferro em 100 h de bioprodução e de 56 U/mL em meio a base de 160 g/L de casca de laranja, 150 g/L água de maceração de milho e 300 g/L de água de parboilização de arroz em 124 h, nas condições de 180 rpm, 30°C e pH_{inicial} 5,5 e 5×10^6 esporos/mL. O pH e a temperatura ótimo do extrato enzimático bruto de PMGL obtido do meio complexo foram de 3,0 e 37°C e com resíduos agroindustriais foram de 4,5 e 55°C, respectivamente. Ao armazenar os extratos enzimáticos a altas (100, 80, 55, 40, 35 e 25°C) e baixas temperaturas (-80, -10 e 4°C) e em diferentes pH (11 a 3) verificou-se que a maior estabilidade ocorreu em -80°C e pH de 4,5, mantendo 50 % da atividade residual por 3336 e 4128 h para o extrato bruto obtido do meio complexo e de 1200 e 228 h para o meio a base de resíduos agroindustriais, respectivamente. A máxima produção de PME foi de 9,4 U/mL em meio composto por 42 g/L de pectina cítrica, 1 g/L de sulfato de magnésio, 10 g/L de fosfato de potássio em 72 h de bioprodução e ao utilizar meio composto por 120 g/L casca de laranja, 301,2 g/L água de maceração de milho e 600 g/L a produção foi de 130 U/mL em 124 h, nas condições de 180 rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5 e concentração de esporos de 5×10^6 esporos/mL. O pH e a temperatura ótimos dos extratos enzimáticos brutos da PME foram de 11 e 55°C, respectivamente. Os extratos enzimáticos brutos obtidos em meio complexo e a base de resíduos agroindustriais, mantiveram a maior estabilidade (50 % da atividade inicial) quando armazenados a 4°C durante 5376 e 2544 h e em pH 11 por 2040 e 1188 h, respectivamente. A máxima atividade de exo-PG foi de 1,85 U/mL em meio composto de 80 g/L de casca de laranja, 100 g/L de água de maceração de milho e 552 g/L de água de parboilização de arroz em 128 h nas condições de 30°C, 180 rpm e pH_{inicial} de 5,5 5×10^6 esporos/mL. O pH e a temperatura ótimos do extrato enzimático bruto da PG foi de 5,5 e 37°C, respectivamente. O extrato enzimático manteve a estabilidade de 50 % da atividade enzimática quando armazenado a -80°C por 808 h e em pH 5 por 184 h, respectivamente. No entanto, para as enzimas PE e PGL as atividades foram consideradas baixas, de 0,43 e 0,35 U/mL, respectivamente.

Palavras-chave: Bioprodução, pectina liase, pectinametilesterase, poligalacturonase, resíduos agroindustriais.

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

**PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF PECTINASE
Aspergillus niger ATCC 9642 IN SUBMERGED FERMENTATION**

Jonaina Pili

Advisors: Eunice Valduga and Geciane Toniazzo

The objective of this study was to evaluate the bioproduction of pectinases (pectin lyase - PMGL, pectate lyase - PGL, pectin esterase – PE, pectin methylesterase - PME and exo-polygalacturonase – exo-PG) by *Aspergillus niger* ATCC 9642, in submerged fermentation using a complex medium with agro-industrial wastes (orange peel, corn steep liquor and rice parboiling wastewater) and partial characterization of root crude extracts obtained. For the screening of variables, held a planning type of Plackett-Burman 12 trials with three central points, with operating conditions set at 180 rpm, 30°C and pH 5.5. The PMGL maximum yield was 21,24 U/mL in a medium composed of 32 g/L of citric pectin, 30 g/L yeast extract and 0.04 g/L of ferrous sulfate in 100 hours of bioproduction and 56 U/mL in a médium composed of 160 g/L of orange peel, 150 g/L of corn steep liquor and 300 g/L of rice parboiling wastewater at 124 h under the conditions of 180 rpm, 30 °C, pH 5,5 and 5×10^6 spores/mL. The optimum pH and temperature of the PMGL root crude enzyme extract obtained from complex medium were 3.0 and 37 °C and from agro-industrial wastes were 4.5 and 55 °C, respectively. By storing the enzyme extracts to high (100, 80, 55, 45, 35 and 25°C) and low (-80,-10 and 4°C) temperatures and at different pH was found that greater stability occurred at -80 °C and pH 4.5, while maintaining 50 % residual activity 3336 and 4128 h for the root crude extract obtained through complex médium and 1200 and 228 h to the agro-industrial wastes medium, respectively. The maximum PME yield was 9.4 U/mL in the medium composed of 42 g/L of citric pectin, 1 g/L magnesium sulfate, 10 g/L of potassium phosphate in 72 hours of bioproduction and using the medium composed of 120 g/L orange peel, 301.2 g/L corn steep liquor and 600 g/L of rice parboiling wastewater was 130 U/mL at 124 h under the conditions of 180 rpm, 30 °C, pH 5.5 and spore concentration of 5×10^6 spores/mL. The optimum pH and temperature of the PME root crude enzyme extracts were 11 and 55 °C, respectively. Root crude enzyme extracts obtained in complex medium and in agro-industrial waste base maintained the highest stability (50% of initial activity) when stored at 4 °C during 5376 and 2544 hours and at pH 11 during 2040 and 1188 h, respectively. The maximum exo-PG activity was 1.85 U/mL in medium composed of 80 g/L of orange peel, 100 g/L of corn steep liquor and 552 g/L of rice parboiling wastewater during 128 h under the conditions of 30 °C, 180 rpm, pH of 5,5 and 5×10^6 spores/mL. The optimum pH and temperature of the PG root crude enzyme extract was 5.5 and 37 °C, respectively. The enzyme extract maintained the stability of 50% of enzyme activity when stored at -80 °C for 808 h and in pH 5 for 184 h, respectively. However, for the PGL and EP enzymes the activities were considered low 0.43 and 0.35 U/mL, respectively.

Keywords: bioproduction, pectin lyase, pectin methylesterase, polygalacturonase, agro-industrial wastes.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE QUADROS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Enzimas	19
2.2. Pectinases.....	19
- Indústrias de sucos de frutas.....	29
- Recuperação de óleos essenciais.....	30
- Indústrias de vinhos	30
- Extração de óleos vegetais	30
- Indústria têxtil.....	31
- Indústria de papel e celulose.....	31
- Ração animal	31
2.3 Considerações Finais.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Micro-organismo	34
3.2. Bioprodução de pectinases em meio complexo	35
3.2.4.1. Maximização e/ou Otimização da produção	37
3.2.4.2. Efeito das concentrações dos sais e pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME	37
3.2.5.1. Maximização e/ou otimização da produção	38
3.3. Bioprodução de pectinases com substratos agroindustriais	39
3.4. Estudo cinético da bioprodução de pectinases	39
3.5 Caracterização parcial dos extratos pectinolítico brutos.....	40
3.6. Determinações analíticas.....	41
3.7. Tratamentos estatísticos.....	45

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Bioprodução de pectinases	46
4.1.4.1. Pectinametilesterase (PME)	53
4.1.4.2. Estudo cinético	57
4.1.4.3. Efeito da concentração de sais e de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade.....	60
4.1.4.4. Caracterização parcial do extrato bruto de PME	62
4.1.5.1. Estudo cinético PMGL.....	72
4.1.5.2. Caracterização parcial do extrato bruto de PMGL	73
4.2. Bioprodução de pectinases em meio a base de substratos agroindustriais.....	79
4.2.1.1. Produção de Exo- poligalcturonase (exo-PG).....	81
4.2.1.2. Estudo cinético exo-PG.....	84
4.2.1.3. Caracterização parcial da exo-poligalcturonase (exo-PG).....	86
4.2.2.1. Estudo cinético de PME.....	96
4.2.3.1. Estudo cinético de PMGL	107
4.2.3.2. Caracterização parcial da pectina liase	109
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	116
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
7. APÊNDICE	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DA CADEIA PRINCIPAL DA PECTINA.	20
FIGURA 2: MODO DE AÇÃO DA PECTINESTERASE (PE). A SETA INDICA O LOCAL DE REAÇÃO DA ENZIMA NA SUBSTÂNCIA PÉCTICA (JAYANI <i>ET AL.</i> , 2005).	22
FIGURA 3: MODO DE AÇÃO DA PECTINA LIASE. A SETA INDICA O LOCAL DE REAÇÃO DA ENZIMA NA SUBSTÂNCIA PÉCTICA (JAYANI <i>ET AL.</i> , 2005).	23
FIGURA 4: A) ASPECTO VISUAL DO FUNGO FILAMENTOSO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> ATCC 9642. B) ASPECTOS DOS PELLETS DO FUNGO FORMADOS NO PROCESSO FERMENTATIVO.	35
FIGURA 5: PRODUÇÃO DE PME (A) E PMGL (B) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO FILAMENTOSO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> ATCC 9642 EM DIFERENTES TEMPOS DE BIOPRODUÇÃO, RESPECTIVAMENTE.	48
FIGURA 6: GRÁFICO DE PARETO COM O EFEITO ESTIMADO (VALOR ABSOLUTO) DAS VARIÁVEIS TESTADAS NO PLACKETT-BURMAN PARA A PME.	51
FIGURA 7: GRÁFICO DE PARETO COM O EFEITO ESTIMADO (VALOR ABSOLUTO) DAS VARIÁVEIS TESTADAS NO PLACKETT-BURMAN PARA A PRODUÇÃO PMGL.	52
FIGURA 8: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PECTINA E FOSFATO DE POTÁSSIO (A), SULFATO DE MAGNÉSIO E PECTINA (B) E FOSFATO DE POTÁSSIO E SULFATO DE MAGNÉSIO (C), E PARA BIOPRODUÇÃO DE PME (U/mL), RESPECTIVAMENTE.	55
FIGURA 9: GRÁFICO DE PARETO COM OS EFEITOS ESTIMADOS (VALOR ABSOLUTO) DAS VARIÁVEIS TESTADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O pH.	57
FIGURA 10: (A) ESTUDO CINÉTICO NA BIOPRODUÇÃO DE PME (U/mL), PRODUÇÃO DE BIOMASSA (G/L), EVOLUÇÃO DO pH E CONSUMO DE K (MG/L) EM FUNÇÃO DO TEMPO (H); (B) CINÉTICA DO CONSUMO DOS SUBSTRATOS COT, N ₂ , MG, MN E FE (MG/L) EM FUNÇÃO DO TEMPO (H).	58
FIGURA 11: ATIVIDADE DA PME EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PECTINA CÍTRICA NO MEIO REACIONAL DE MEDIDA.	61
FIGURA 12: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA ATIVIDADE DE PME (U/mL) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (°C) E pH.	64
FIGURA 13: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PME SUBMETIDO A BAIXAS (4,-10 E -80°C) E A ALTAS TEMPERATURAS (100, 60, 55, 40 E 30°C).	65
FIGURA 14: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PME SUBMETIDO A DIFERENTES pH 5, 7, 9 E 11.	68
FIGURA 15: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA BIOPRODUÇÃO DE PMGL (U/mL) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA E PECTINA (A), CONCENTRAÇÃO DE PECTINA E SULFATO DE FERRO (B) E CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE FERRO E EXTRATO DE LEVEDURA (C), RESPECTIVAMENTE.	71
FIGURA 16: (A) ESTUDO CINÉTICO NA BIOPRODUÇÃO DE PMGL (U/mL), PRODUÇÃO DE BIOMASSA (G/L), EVOLUÇÃO DO pH E CONSUMO DE MG, FE E MN (MG/L) EM FUNÇÃO DO TEMPO (H); (B) CINÉTICA DO CONSUMO DOS SUBSTRATOS COT, N ₂ E K (MG/L) EM FUNÇÃO DO TEMPO (H), RESPECTIVAMENTE.	72
FIGURA 17: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA ATIVIDADE DE PMGL (U/mL) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (°C) E pH.	75
FIGURA 18: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PMGL SUBMETIDO A (A) ALTAS (100, 80, 55, 40, 35 E 25°C) E (B) BAIXAS TEMPERATURAS (-80, -10 E 4°C), RESPECTIVAMENTE.	77
FIGURA 19: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PMGL SUBMETIDO A DIFERENTES pH 3; 3,4;4,5; 5,5; 6 E 7	79

FIGURA 20: CURVA DE CONTORNO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (A) ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO E CASCA DE LARANJA, (B) ÁGUA PARBOILIZADA DE ARROZ E CASCA DE LARANJA E (C) ÁGUA PARBOILIZADA DE ARROZ E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO.....	83
FIGURA 21: (A) ESTUDO CINÉTICO NA BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG (U/mL), EVOLUÇÃO DO pH E CONSUMO PECTINA (%) E N ₂ (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO (H); (B) CINÉTICA DO CONSUMO MG, K, MN FE E AÇÚCARES REDUTORES (MG/L) EM FUNÇÃO DO TEMPO (H), RESPECTIVAMENTE.....	85
FIGURA 22: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA ATIVIDADE DE PG (U/mL) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (°C) E pH, RESPECTIVAMENTE.....	88
FIGURA 23: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA EXO-PG SUBMETIDO A (A) BAIXAS (4, -10 E -80°C) E (B) ALTAS TEMPERATURAS (25, 35, 40, 55, 80 E 100°C).	90
FIGURA 24 – ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA EXO-PG SUBMETIDO AOS pH DE 4, 5, 6, 7, 9 E 11.....	92
FIGURA 25: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTORNO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (A) ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO E CASCA DE LARANJA, (B) ÁGUA PARBOILIZADA DE ARROZ E CASCA DE LARANJA E (C) ÁGUA PARBOILIZADA DE ARROZ E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO, RESPECTIVAMENTE.....	95
FIGURA 26: ESTUDO CINÉTICO DA BIOPRODUÇÃO DE PME EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE (U/mL), PRODUÇÃO DE BIOMASSA (G/L), NITROGÊNIO E pH PELO TEMPO (HORAS) (A) E EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE CARBONO E MINERAIS PELO TEMPO (HORAS) (B), RESPECTIVAMENTE.....	98
FIGURA 27: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA ATIVIDADE DE PME (U/mL) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (°C) E pH, RESPECTIVAMENTE.....	100
FIGURA 28: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PME SUBMETIDO A (A) BAIXAS (4, -10 E 80°C) E (B) ALTAS TEMPERATURAS.	101
FIGURA 29: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PME SUBMETIDO AOS pH DE 5, 5,5, 7, 9,8 E 11.....	103
FIGURA 30: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTORNO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (A) ÁGUA PARBOILIZADA DE ARROZ E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO, (B) ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO E CASCA DE LARANJA E (C) ÁGUA PARBOILIZADA DE ARROZ E CASCA DE LARANJA, RESPECTIVAMENTE.	106
FIGURA 31: (A) ESTUDO CINÉTICO NA BIOPRODUÇÃO DE PMGL (U/mL), PECTINA (%), EVOLUÇÃO DO pH E NITROGÊNIO EM FUNÇÃO DO TEMPO (H); (B) CINÉTICA DO CONSUMO DOS SUBSTRATOS CONSUMO DE K , MG, MN, FE E AÇÚCAR REDUTOR, EM FUNÇÃO DO TEMPO (H).....	108
FIGURA 32: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA ATIVIDADE DE PMGL (U/mL) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (°C) E pH, RESPECTIVAMENTE.....	111
FIGURA 33: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PMGL SUBMETIDO A ALTAS TEMPERATURAS 100, 80, 55, 40, 35 E 25°C.....	112
FIGURA 34: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PMGL SUBMETIDO A BAIXAS TEMPERATURAS DE 4, -10 E -80°C.	113
FIGURA 35: ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DA PME SUBMETIDO A DIFERENTES pH 3, 3,5, 4,5, 5, 6, 7 E 9	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO DO TIPO PLACKETT & BURMAN PARA A BIOPRODUÇÃO DE PECTINASES.	36
TABELA 2: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA A PRODUÇÃO DE PME.	37
TABELA 3: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 PARA PRODUÇÃO DE PMGL.	38
TABELA 4: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 PARA PRODUÇÃO DE PMGL.	38
TABELA 5: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 PARA BIOPRODUÇÃO DE PECTINASES.	39
TABELA 6: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 DE TEMPERATURA E pH ÓTIMOS DAS ENZIMAS EXO-PG E PMGL.	40
TABELA 7: VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 DE TEMPERATURA E pH ÓTIMOS DA ENZIMA PME.	40
TABELA 8: ATIVIDADE DA PECTINA LIASE (U/ML) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.	46
TABELA 9: MATRIZ DO PLANEJAMENTO TIPO PLACKETT-BURMAN VALORES REAIS E CODIFICADOS E RESPOSTAS EM PRODUÇÃO DAS ENZIMAS PECTINAMETILESTERASE (PME), PECTINA LIASE (PMGL), PECTINESTERASE (PE) E PECTATO LIASE (PGL).	50
TABELA 10: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 (VALORES CODIFICADOS E REAIS) E RESPOSTA EM PRODUÇÃO DE PECTINAMETILESTERASE E pH.	53
TABELA 11: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA ATIVIDADE DE PECTINAMETILESTERASE.	54
TABELA 12: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A BIOPRODUÇÃO DE PME DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3	54
TABELA 13: ATIVIDADE DE PME (U/ML) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO.	56
TABELA 14: ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS NaCl, CaCl ₂ E A INTERAÇÃO NaCl/CaCl ₂	60
TABELA 15: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM VALORES CODIFICADOS (REAIS) E RESPOSTA EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINAMETILESTERASE EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	62
TABELA 16: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 PARA ATIVIDADE DE PME EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	63
TABELA 17: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DE PME DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	63
TABELA 18: PARÂMETROS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA PARA O EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DA PME OBTIDO PELO <i>A. NIGER</i> ATCC 9642.	67
TABELA 19: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 (VALORES REAIS E CODIFICADOS) E RESPOSTAS EM PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE E pH.	69
TABELA 20: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T (2) DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 PARA ATIVIDADE DE PMGL.	70
TABELA 21: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A BIOPRODUÇÃO DE PMGL DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3	70
TABELA 22: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM VALORES CODIFICADOS (REAIS) E RESPOSTA EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINA LIASE.	74

TABELA 23: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² PARA ATIVIDADE DE PMGL.	74
TABELA 24: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DE PMGL DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	75
TABELA 25: PARÂMETROS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA PARA O EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DA PMGL OBTIDO PELO <i>A. NIGER</i> ATCC 9642.	78
TABELA 26: TEORES DE PECTINA, NITROGÊNIO E CARBONO ORGÂNICO TOTAL (TOC) DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.	79
TABELA 27: TEORES DE MINERAIS DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.	80
TABELA 28: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ (VALORES REAIS E CODIFICADOS) E RESPOSTAS EM PRODUÇÃO DA ENZIMA EXO-PG.	81
TABELA 29: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ PARA ATIVIDADE DE EXO-POLIGALACTURONASE.	82
TABELA 30: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	82
TABELA 31: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (COM 3 PONTOS CENTRAIS) E RESPOSTA DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA E pH.	87
TABELA 32: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² PARA ATIVIDADE DE EXO-POLIGALACTURONASE.	87
TABELA 33: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ²	87
TABELA 34: PARÂMETROS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA PARA O EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DA EXO-PG OBTIDO PELO <i>A. NIGER</i> ATCC 9642.	91
TABELA 35: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ VALORES CODIFICADOS (REAIS) E RESPOSTAS EM PRODUÇÃO DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE.	93
TABELA 36: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ PARA ATIVIDADE DE PECTINAMETILESTERASE.	94
TABELA 37: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A BIOPRODUÇÃO DE PME DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	94
TABELA 38: ATIVIDADE PME (U/mL) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMM.	96
TABELA 39: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² COM VALORES CODIFICADOS (REAIS) E RESPOSTA EM ATIVIDADE PECTINAMETILESTERASE EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH ÓTIMOS.	99
TABELA 40: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² PARA ATIVIDADE DE PME.	100
TABELA 41: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DE PME DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	100
TABELA 42: PARÂMETROS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA PARA O EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DA PME OBTIDO PELO <i>A. NIGER</i> ATCC 9642.	102
TABELA 43: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ VALORES CODIFICADOS (REAIS) E RESPOSTAS EM PRODUÇÃO DA ENZIMA PECTINA LIASE E pH.	104
TABELA 44: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ PARA ATIVIDADE DE PECTINA LIASE.	105
TABELA 45: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A BIOPRODUÇÃO DE PMGL DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	105

TABELA 46: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM VALORES CODIFICADOS (REAIS) E RESPOSTA EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINA LIASE EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	109
TABELA 47: COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ERRO PADRÃO, VALORES DE P E T DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 PARA ATIVIDADE DE PMGL EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA E pH.	110
TABELA 48: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DE PMGL DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2	110
TABELA 49: PARÂMETROS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA PARA O EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DA PMGL OBTIDO PELO <i>A. NIGER</i> ATCC 9642.	114
TABELA 50 – ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE PECTINAMETILESTERASE (PME) EM TODOS OS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO TIPO PLACKETT & BURMAN POR UM PERÍODO DE ATÉ 96 HORAS DE BIOPRODUÇÃO.	133
TABELA 51 – ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE (PMGL) EM TODOS OS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO TIPO PLACKETT & BURMAN POR UM PERÍODO DE ATÉ 96 HORAS DE BIOPRODUÇÃO.....	134
TABELA 52 – ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE PECTATO LIASE (PGL) EM TODOS OS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO TIPO PLACKETT & BURMAN POR UM PERÍODO DE ATÉ 96 HORAS DE BIOPRODUÇÃO.....	135
TABELA 53 – ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE PECTINA ESTERASE (PE) EM TODOS OS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO TIPO PLACKETT & BURMAN POR UM PERÍODO DE ATÉ 96 HORAS DE BIOPRODUÇÃO.....	136

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: OCORRÊNCIA E PRINCIPAIS AGENTES PRODUTORES DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.	25
QUADRO 2: PRINCIPAIS APLICAÇÕES DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

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

1. INTRODUÇÃO

No mercado mundial a diversidade industrial mostra um amplo campo de aplicação de enzimas, abrangendo as áreas, alimentar, têxtil e química, apontando redução significativa da energia necessária para a obtenção de produtos manufaturados. As enzimas, com potencial tecnológico, são utilizadas como catalisadores de processo, com capacidade de transformar as matérias-primas em produtos com maior valor agregado, devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação.

Dada a inerente habilidade das enzimas, como consequência da sua estrutura proteica, este processo representa um grande desafio tecnológico, o que explica o número ainda relativamente reduzido de processos enzimáticos operando em escala industrial.

Um grupo de enzimas com grande potencial a oferecer à indústria é o das pectinases, pois possuem inúmeras aplicações, tais como a redução da viscosidade, para melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação (GUMMANDI & PANDA, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005) no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau (DA SILVA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005) para melhorar a extração de óleos vegetais (LIMA *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2005) na extração de polpa de tomate (ALMEIDA *et al.*, 2005) e no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxtil e de papel (ALMEIDA *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2004; TARAGANO & PILOSOFF, 1999; LIMA *et al.*, 2005).

As pectinases são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação de moléculas complexas denominadas substâncias pécticas, que são polissacarídeos estruturais da parede primária das células vegetais jovens e principais componentes da lamela média, através da reação de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (PEDROLI *et al.*, 2009).

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de micro-organismos, mas os fungos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90 % das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO *et al.*, 2002; BRAVO *et al.*, 2000). Uma grande variedade de bactérias

(*Bacillus polymyxa*, *Erwinia* ssp., *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*), leveduras (*Bacteroides fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*) e de fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma reisei*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*) são conhecidos como bons produtores de enzimas pectinolíticas (DE GREGÓRIO *et al.*, 2002; KASHYAP *et al.*, 2001). Na maioria dos casos o fungo *Aspergillus niger* é utilizado para produção industrial, já que é classificado como GRAS (generally recognized as safe) pelo Food and Drug Administration (FDA), órgão do governo dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e medicamentos (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 1996).

Visando a redução de custos na bioprodução de pectinases, os resíduos agroindustriais como casca de café, casca e bagaço de frutas cítricas, farelo de trigo, bagaço de uva, bagaço de mandioca e bagaço de beterraba doce, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz podem ser utilizados como substratos para a produção de compostos de maior valor agregado como enzimas, etanol, proteínas, ácidos orgânicos e compostos de aroma, desde que se escolha o micro-organismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (BRAVO *et al.*, 2000). Neste contexto, a fermentação submersa desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos líquidos e sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais as enzimas, de grande interesse para segmentos industriais, além de valor agregado.

A produção de pectinases por micro-organismos é influenciada pelas condições de cultivo, a qual pode estimular ou inibir a síntese de enzimas (VISWANATHAN & JAGADEESHBABU, 2008). Assim, ao estudar um novo micro-organismo produtor de pectinases, o primeiro passo é a otimização das condições de cultivo, ou seja, conhecer os diversos aspectos que regulam a síntese e a atividade da enzima (CORDEIRO & MARTINS, 2009). Após conhecer a condição de cultivo que resulta em maiores níveis de atividade enzimática, é necessário isolar e caracterizar estas enzimas quanto a sua estabilidade, para posteriores definições de suas possíveis aplicações industriais.

Com base no exposto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a produção de pectinases por fermentação submersa utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio complexo e composto por resíduos agroindustriais. Para tal, alguns objetivos específicos foram traçados:

- ✓ Avaliar os efeitos da composição do meio de cultivo complexo visando a otimização da bioprodução das pectinases (pectinametilesterase e pectina liase), empregando metodologia de planejamento de experimentos;
- ✓ Maximizar e/ou otimizar a bioprodução das pectinases (exo-Poligalacturonase, Pectinametilesterase e Pectina liase) em meio de cultivo composto por resíduos agroindustriais (casca de laranja triturada, farelo de trigo e água de maceração de milho) empregando metodologia de planejamento de experimentos;
- ✓ Caracterizar as enzimas em termos de pH e temperatura ótima, estabilidade a diferentes temperaturas e pHs e determinação de parâmetros cinéticos do processo.

Baseado nisto, dividiu-se este trabalho em itens (subitens), conforme descrição resumida apresentada a seguir. No item 2, será apresentada uma breve revisão da literatura acerca dos temas envolvidos no presente estudo, relacionados a produção de pectinases, aplicação industrial, mercado atual e perspectivas. No item 3, será apresentada o desenvolvimento de metodologia para a produção e caracterização das enzimas pécticas (PG, PME, PMGL, PE e PGL). No item 4, serão apresentados e discutidos os resultados do estudo, o qual incluem a bioprodução das pectinases, caracterização parcial, cinética de produção e estabilidade de estocagem a diferentes pH e temperaturas. No item 5, serão apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item apresenta um levantamento de dados bibliográficos abordando os seguintes assuntos pertinentes: enzimas pectinolíticas (protopectinases, pectinesterases e despolimerases), produção microbiana, caracterização e especificidade, aplicação industrial das pectinases e mercado atual.

2.1. Enzimas

Enzimas são substâncias biocatalisadoras complexas extremamente eficientes e altamente específicas, sintetizadas no interior das células vivas, mas que também exercem atividade fora delas. Como grande parte das proteínas sintetizadas são enzimas intracelulares citoplasmáticas, estas são obtidas e avaliadas somente através do rompimento da estrutura celular (HOONDAL *et al.*, 2002).

Uma das características notáveis das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos são a especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato, em condições brandas de reação e menores problemas ambientais e toxicológicos. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

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

2.2. Pectinases

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, reduzem o amargor excessivo provocado por cascas de citros e aumentam o aroma e as substâncias voláteis das frutas e vegetais. Degradam, ainda, outros componentes de alto peso molecular reduzindo a viscosidade e aumentando o rendimento na extração de sucos. Uma hidrólise das substâncias pécticas da ordem de 5 % promove uma redução da viscosidade de 50 % (MERCÊS, 2012).

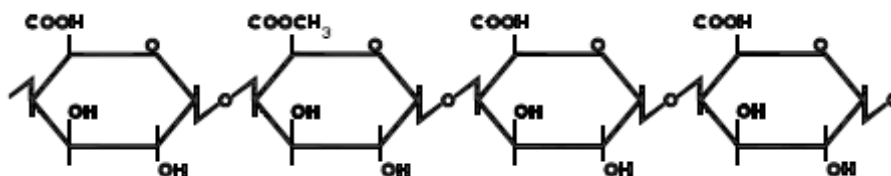
Pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4, entre unidades de ácidos galaturônicos ou seu derivado metoxilado. São produzidas por vegetais e micro-organismos e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Em virtude disso as pectinases podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças. Sua aplicação na indústria de alimentos pode trazer uma série de benefícios à obtenção de produtos de origem vegetal (KOBLITZ, 2010).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes nas células vegetais as quais incluem poligalacturonase (PG), esterase pectina, pectina liase e pectato liase com base no seu modo de ação (DINU *et al.*, 2007, MARTIN *et al.*, 2007).

As substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais presentes nas células vegetais, responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos da planta. São caracterizados por longas cadeias de ácido galaturônico, que são grupos carboxila, que às vezes são modificados através da adição de grupos metil, formando grupos metoxila. Enzimas pécticas atuam quebrando ligações glicosídicas das longas cadeias de carbono (poligalacturonase, pectina liase e pectato liase) dividindo os grupos metoxila (pectina esterase)(COELHO *et al.*, 1995).

Quimicamente é um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido D-galaturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (UENOJO & PASTORE, 2007). A Figura 1 mostra a estrutura química da cadeia principal da pectina.

Figura 1: Estrutura química da cadeia principal da pectina.



Os ácidos pectínicos contêm até 75 % de unidades de galacturonato metilado. Dentro de condições satisfatórias, ácidos pectínicos são capazes de formar géis com

açúcares e ácidos ou, se apropriadamente contiver baixo conteúdo de metoxil, com certos íons metálicos (KASHYAP *et al.*, 2001).

A pectina é um termo genérico para a mistura de composição extremamente diferente, contendo ácido pectínico como maior componente dos grupos carboxílicos e tem a capacidade de formar géis (KASHYAP *et al.*, 2001).

Protopectina é a substância péctica originalmente insolúvel em água, localizada principalmente na lamela média. As protopectinas, compostas por unidades de ácidos galacturônicos ligadas ao cálcio por ligações iônicas de caráter acentuadamente forte, são insolúveis em água e estão presentes nos tecidos vegetais intactos (KASHYAP *et al.*, 2001, JAYANI *et al.*, 2005).

Devido à grande diversidade de pectinas nas plantas e sua consequente complexidade, são necessárias diferentes pectinases com diversas formas de ação: poligalacturonase (PG), pectinesterase (PE), pectinaliase (PL) e pectatoliase (PAL). PG, PL e PAL são consideradas enzimas despolimerizantes, pois clivam a molécula de pectina entre os monômeros de ácido galacturônico, seja por hidrólise (PG) ou β -eliminação (PL, PAL). PE catalisa a desesterificação dos grupamentos metoxil da pectina (MARTOS *et al.*, 2013).

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

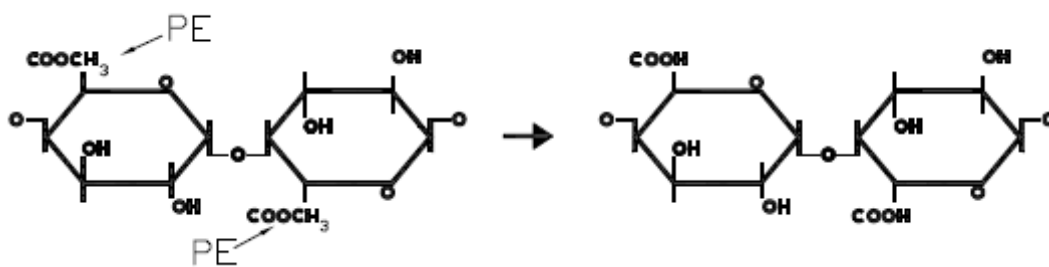
a) *Protopectinases (PPases)* (E.C. 3.1.1.11): também conhecidas por pectinosinases que catalisam a hidrólise da protopectina, originando ácido péctico e pectina, diminuindo a rigidez da parede celular durante o amolecimento e o amadurecimento dos vegetais. Existem dois tipos de PPases, o tipo A que faz a clivagem na parte interna da molécula do ácido poligalacturônico da protopectina, enquanto que a do tipo B faz a clivagem nas cadeias de polissacarídeos que podem estar conectados à cadeia de ácido poligalacturônico e constituintes da parede celular (JAYANI *et al.*, 2005).

b) *Pectinesterases (PE)* (E.C. 3.1.1.1): estas enzimas são também denominadas de polimetilgalacturonato esterase, as quais catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico. A pectina

de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase (PG) (ALKORTA *et al.*, 1998; GAVA, 1998).

As pectinesterases são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras e plantas e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais e podem estar envolvidas em mudanças das substâncias pécicas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (ALKORTA *et al.*, 1998). São reconhecidas várias isoformas de PE, que variam em termorresistência e em número de acordo com a fonte vegetal. Em suco de laranja existem pelo menos sete isoformas, com pesos moleculares, resistência térmica e atividades diferentes (TRIBESS, 2003). A Figura 2 demonstra o modo de ação da pectinesterase.

Figura 2: Modo de ação da pectinesterase (PE). A seta indica o local de reação da enzima na substância pécica (JAYANI *et al.*, 2005).



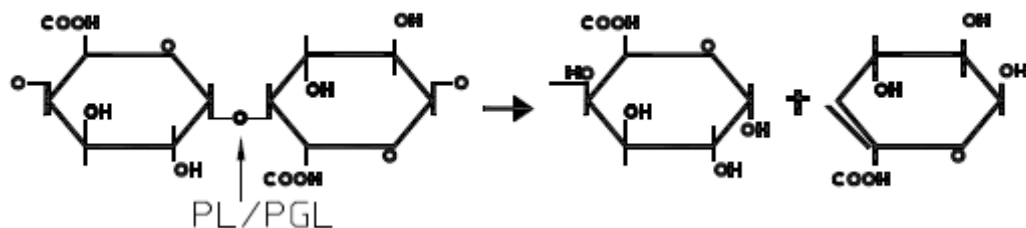
c) *Despolimerases*: catalisam a quebra das ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) entre os monômeros do ácido D-galacturônico. Essas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise, catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminção (liases). As despolimerases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

c.1) *Liases*: são conhecidas como transeliminases, pois rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (KASHYAP *et al.*, 2001).

A pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL), também chamada de transeliminase, é uma enzima que atua na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de transeliminção de hidrogênio, onde clivam as ligações glicosídicas no carbono 4 e simultaneamente eliminam hidrogênio do carbono 5. Estas enzimas são

subdivididas em dois tipos, as endopolimetilgalacturonato liases [EndoPMGL (E.C. 4.2.2.10)], que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações α (1 $\rightarrow$ 4) da pectina e as exopolimetilgalacturonato liases [ExoPMGL], que catalisam a ruptura das ligações α (1 $\rightarrow$ 4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora. Atuam preferencialmente no ácido pectínico (MARTIN, 2006; JAYANI *et al.*, 2005). A Figura 3 demonstra o modo de ação da pectina liase.

Figura 3: Modo de ação da pectina liase. A seta indica o local de reação da enzima na substância pectica (JAYANI *et al.*, 2005).



A pectato liase (poligalacturonato liases, PGL) (E.C 4.2.2.2), são liases que têm preferência por ácido pectico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação), podendo ser classificadas ainda como endo ou exo – PGL (MARTIN, 2006).

c.2) Hidrolases: incluem as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases, podem apresentar ação endo - (hidrólise randômica) ou exo-(hidrólise sequencial) (UENOJO, 2003).

As poligalacturonases (PG) (E.C. 3.2.1.15) são enzimas que catalisam a hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico de que é constituída a pectina. Como a poligalacturonase é mais ativa na degradação de pectinas desmetiladas, a ação da pectinametilesterase prepara, ou seja, torna a pectina acessível à degradação realizada por essa enzima, causando sua despolimerização (CARVALHO *et al.*, 2001; ASSIS *et al.*, 2004; LOHANI *et al.*, 2004; JAYANI, SAXENA & GUPTA, 2005).

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

A reação de despolimerização da pectina acontece quando a poligalacturonase catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α -1,4, que se localizam entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia da pectina, com a introdução de água pela ponte de hidrogênio (BENEN & VISSER, 2003; RESENDE *et al.*, 2004).

As polimetilgalacturonases (PMG), também conhecida por pectinametilesterase, têm preferência pelo substrato altamente metoxilado - ácido pectínico (MARTIN, 2006).

2.2.1. Produção de pectinases microbianas em FS

Nos processos submersos o micro-organismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação e aeração (micro-organismos aeróbios) e controles de: pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos micro-organismos (MALAJOVICH, 2004).

A bioprodução começa com a escolha do agente biológico adequado (micro-organismo); segue com a transformação da matéria-prima, em condições que podem exigir esterilização, aeração e controle do processo (pH, temperatura, etc.); e finaliza com a separação e purificação do produto final (MALAJOVICH, 2004; SCHMIDELL *et al.*, 2001). A parte central de um processo é o crescimento do micro-organismo industrial em condições ambientais que estimulem a síntese do produto comercial que se pretende obter, portanto, conforme Trevan *et al.* (1990), faz-se necessário conhecer os micro-organismos, controlar seu metabolismo e crescimento, bem como, manejá-los em grande escala.

A composição dos complexos pectinolíticos de origem microbiana varia de acordo com a espécie do micro-organismo produtor e, dessa forma, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas com propriedades adequadas a cada processo é fundamental para a utilização industrial das mesmas. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são de grande interesse na produção de enzimas em virtude das inúmeras vantagens apresentadas por estes organismos, tais como: crescimento rápido, não requerem amplos espaços para crescimento; são capazes de degradar variados substratos, inclusive resíduos e subprodutos agro-industriais (MARTINS, 2006). No

Quadro 1 podem ser observados a ocorrência e os principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas.

Dos micro-organismos citados no Quadro 1, as preparações de pectinases mais comumente utilizadas são de origem fúngica, principalmente de *Penicillium* e *Aspergillus* (SANTOS, 2007).

Quadro 1: Ocorrência e principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas.

Enzima Pectinolítica	Principais Agentes Produtores
Protopectinase tipo A	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Galactomyces reesei</i> , <i>Trichosporon fragilis</i>
Protopectinase tipo B	<i>Trametes</i> sp.
Endo-poligalacturonase	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>A. niger</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Peecilomyces clavisporus</i>
Exo-poligalacturonase	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Bacteróides thetaiotamicron</i> , <i>E. chrysanthemi</i> , <i>Alternaria mali</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Bacillus</i> sp.
Pectatoliasas	<i>Colletotrichum lindemuthionum</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>Amucala</i> sp., <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>C. magna</i> , <i>E. chrysanthemi</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>C. gloeosporioides</i>
Pectinaliasas	<i>Aspergillus</i> sp., <i>A. japonicus</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. paxilli</i> , <i>Pythium splendens</i> , <i>Pichia pinus</i> , <i>Thermoascus aratniacus</i>
Pectinesterases	<i>Rhodotorula</i> sp., <i>Phytophthora infestans</i> , <i>E. chrysanthemi</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lachnospira pectinoschiza</i> , <i>P. solanacearum</i> , <i>A. niger</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>P. occidentalis</i>

Fonte: JAYANI *et al.* (2005).

Enzimas pectinolíticas podem ser produzidas em ambas as fermentações, sólidas e submersas (FONTANA *et al.* 2009). Martins *et al.* (2005) utilizaram fermentação submersa para caracterizar uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus*

aurantiacus. Foi investigada a estabilidade térmica e estabilidade frente às variações do pH para esta enzima. Em pH 3,0 – 3,5 a poligacturonase manteve cerca de 91 % da atividade original, em pH elevados houve uma queda na estabilidade. No caso da temperatura, até 50°C, a poligalacturonase conservou 80 % da sua atividade original e manteve apenas 6 % dessa atividade quando exposta a uma temperatura de 70°C.

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

Neste caso a otimização das condições, particularmente parâmetros químicos e físicos, são de vital importância no desenvolvimento do processo fermentativo, devido ao seu impacto sobre a economia e a praticidade do mesmo. A metodologia de planejamento de experimentos permite executar estes experimentos em todas as possíveis combinações destes níveis, sendo chamada de matriz de planejamento. Para evitar a ocorrência de distorções estatísticas nos resultados, isto é, para impedir erros atípicos que sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, os ensaios devem ser realizados em ordem totalmente aleatória (BARROS NETO *et al.*, 1996; FRANCIS *et al.*, 2003).

As fermentações submersas (FS) incluem uma variedade grande de processos microbianos na qual a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido.

Murthy *et al.* (1993) descreveram que a diferença entre dois bioprocessos refere-se à utilização, na fermentação em estado sólido (FES), do substrato sólido úmido o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FS, em que se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submerso no líquido. Gervais & Molin (2003) relatam que a principal diferença entre FS e FES está na capacidade da mistura dos sistemas. As FS são reações de mistura perfeita nas quais, em teoria, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos, nutrientes e metabólitos. No entanto, nos cultivos em meio sólido, encontram-se uma baixa velocidade, sendo que, para se chegar à homogeneidade, seria necessária excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular (PALMA, 2003). A produção de pectinases por

micro-organismos pode ser induzida tanto por processos de fermentação submersa quanto em estado semi-sólido (BARENSE *et al.*, 2001; HOONDAL *et al.*, 2002).

A maioria das enzimas produzidas por fermentações e vendidas em escala industrial são extracelulares, uma vez que as intracelulares ou ligadas a membrana exigem um processo de recuperação mais complexo. Muitas dessas enzimas são comercializadas como preparações impuras (COLLACO *et al.*, 1997).

Os fungos filamentosos são micro-organismos que se destacam devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais (OGAWA & SHIMIZU, 1999; SCHUEGERL, 2000; POLIZELI *et al.*, 2005, STROPARO *et al.*, 2012, GOMES *et al.*, 2011, ZENI *et al.*, 2013).

O gênero *Aspergillus* se destaca como um excelente produtor de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental (BERKA, DUNN-COLEMAN, WARD, 1992; WARD *et al.*, 2005; LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007; MATA-GOMEZ *et al.*, 2009; DHILLON *et al.*, 2012; GOSWAMI *et al.*, 2012; CHAVAN; DESHPANDE, 2013; PATRO *et al.*, 2014; SHIVANNA, VENKATESWARAN, 2014).

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

Dalboge (1997) menciona que, apesar da extensa aplicação de pectinases de *A. niger* no setor comercial, muitas apresentam baixa atividade de poligalacturonase (PG) e alta atividade de PME e PMGL. Além disso, o uso da mistura enzimática produzida por *Aspergillus* pode resultar em decréscimo da estabilidade do suco de fruta, pela precipitação dos derivados de pectina desesterificados com íons de cálcio presentes no suco e na liberação de metanol para o sistema digestivo. Atualmente, novos estudos têm sido incentivados, buscando o conhecimento e a aplicação de novas pectinases fúngicas no setor comercial.

Bai *et al.* (2004) produziram pectinases utilizando o fungo *Aspergillus niger*, sendo a fonte de carbono o açúcar da polpa de beterraba, a fonte de nitrogênio e água foi o efluente líquido da produção de glutamato de sódio.

Atualmente os esforços concentram-se no emprego de subprodutos agro-industriais como substrato, buscando obter produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção. Os grupos de pesquisa existentes utilizam substratos naturalmente abundantes em sua região. Vários resíduos agro-industriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, casca de maracujá, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju, entre outros (CORREIA, 2004).

2.2.2 Caracterização e especificidade

A desnaturação de proteínas é uma alteração sensível na estrutura original da proteína, sem que ocorra alteração na sequência dos aminoácidos, isto é, sem que haja rompimento ou alterações de ligações químicas primárias, que ligam aminoácidos entre si (SGARBIERI, 1996; SOUZA, 2008). Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas o calor é que provoca mais modificações nas proteínas, dentro do contexto biológico (GOMES *et al.*, 2007).

As proteínas possuem temperaturas características nas quais apresentam o máximo de estabilidade. A maioria das proteínas são estáveis a temperatura de refrigeração, outras na temperatura ambiente. À medida que a temperatura se eleva acima de 40 – 50 °C, praticamente, todas as proteínas tornam-se instáveis, tendendo uma alteração da conformação original. Quanto ao pH, algumas proteínas mantêm suas configurações nativas a valores de pH muito baixos, se a temperatura for mantida baixa. Outras são drasticamente desdobradas, de tal forma que apenas um pequeno decréscimo no pH é suficiente para induzir mudanças de conformação semelhantes àquelas que as proteínas mais estáveis só experimentam pela ação combinada do calor e pH baixo (SOUZA, 2008).

Devido às condições de processamento na indústria, como elevadas temperaturas, as enzimas podem se tornar instáveis e se tornarem totalmente inativas durante o processo, assim torna-se importante conhecer certas características das enzimas para avaliar qual melhor faixa de operação (SOUZA, 2008).

Alguns trabalhos reportados da literatura além da produção das pectinases realizaram estudos de estabilidade enzimática. Zheng & Shetty (2000) verificaram o efeito da temperatura e pH na estabilidade da poligalacturonase produzida por *Lentinus edodes* utilizando resíduos de frutas como substrato. Naidu & Panda (2003) estudaram o efeito do pH e da temperatura na desativação de enzimas pectinolíticas produzidas por fermentação submersa num meio composto por glicose, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e o micro-organismo *A. niger* como agente da fermentação. Martins *et al.* (2005) avaliaram a produção, fermentação submersa, e a caracterização de poligalacturonases por *Thermoascus aurantiacus*.

2.2.3. Aplicação industrial das pectinases

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

- Indústrias de sucos de frutas

As substâncias pécticas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos das frutas e sua presença causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração. A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50 % o tempo de filtração.

A combinação de pectinases, celulasas e hemicelulasas, chamadas coletivamente de enzimas de maceração são usadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. A hidrólise enzimática das paredes celulares aumenta o rendimento de

extração, a polpa resultante tem baixa viscosidade e a quantidade de resíduos da polpa é reduzida. O uso de enzimas de maceração aumenta o rendimento da extração e melhora o processamento, sem aumento de custos. Essas enzimas são utilizadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta. Após a extração, pectinases são adicionadas para clarificação e diminuição de viscosidade para facilitar a filtração e concentração.

- Recuperação de óleos essenciais

Após a extração do suco, as partículas de albedo e a emulsão óleo-água são separadas. Esta emulsão é passada em um ciclone e, a seguir, centrifugada para produzir uma emulsão rica em óleo, que é concentrada. A aplicação de pectinases hidrolisa os complexos de pectina-proteína, liberando o óleo, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final.

- Indústrias de vinhos

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

- Extração de óleos vegetais

A degradação da parede celular por enzimas pectinolíticas permite seu uso para extração de óleo vegetal em processo aquoso, pela liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm óleo. Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulasas e hemicelulasas começaram a ser utilizadas

para extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração. O uso de enzimas de maceração aumenta a quantidade de agentes anti-oxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extra virgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a extração, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade.

- Indústria têxtil

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

- Indústria de papel e celulose

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

- Ração animal

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

Além das aplicações industriais de pectinases citadas acima, as pectinases podem ser utilizadas na fermentação de café e chás, na produção de alimentos para bebês como purês de frutas e legumes.

Muitos estudos têm sido realizados sobre as aplicações de enzimas pectinolíticas em diferentes processos industriais, como apresentado no Quadro 2.

Quadro 2: Principais aplicações das enzimas pectinolíticas.

Aplicações	Referências
Clarificação de sucos e vinhos	Reid & Ricard (2000); Hoondal <i>et al.</i> (2002); Gummadi & Panda (2003); Busto <i>et al.</i> (2006); Olivier <i>et al.</i> (2008); Sandri <i>et al.</i> (2011); Sandri <i>et al.</i> (2013).
Tratamento e degomagem de fibras vegetais, processo de cura de café, cacau e tabaco.	Nair & Panda (1997); Silva <i>et al.</i> (2000); Kashyap <i>et al.</i> (2001); Kapoor <i>et al.</i> (2001); Sharma & Satyanarayana (2006).
Extração de óleos essenciais e pigmentos de materiais vegetais.	Coelho <i>et al.</i> (1995); Hoondal <i>et al.</i> (2002); Gummadi & Panda (2003); Hadj-Taieb <i>et al.</i> (2006).
Produção de têxteis e de papéis	Reid & Ricard (2000); Olsson <i>et al.</i> (2003); Kaur <i>et al.</i> (2004); Jayani <i>et al.</i> (2005); Sharma & Satyanarayana (2006) Lang & Dörnenburg (2000); Uenojo & Pastore (2007).
Tratamento de águas de lavagem	Aitken (1993); Karam & Nicell (1997).

2.2.4. Mercado atual e perspectivas

Pectinases, associadas com outras carbohidrolases, como celulasas, vêm sendo estudadas visando à sua aplicação na extração de óleos vegetais, como óleo de oliva, soja, semente de abóbora e dendê (TEIXEIRA *et al.*, 2013; JIAO *et al.*, 2014). O uso de enzimas durante a maceração para extração de óleo torna o processo mais brando e aumenta a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extravirgem (UENOJO & PASTORE, 2007). Essas enzimas também estão sendo empregadas para a produção de bioetanol de segunda geração na liberação de açúcares

fermentáveis a partir de biomassa vegetal, ampliando ainda mais a aplicabilidade (THOMPSON *et al.*, 2013; REZIC *et al.*, 2013; VIJAYALAXMI *et al.*, 2013).

O fator limitante para a aplicação da biocatálise nos mais variados processos industriais, no entanto, ainda é o alto custo das enzimas disponíveis no mercado. Particularmente em países emergentes como o Brasil, trabalhar com estes biocatalisadores é extremamente dispendioso devido às taxas de importação e aos preços internacionais, ainda mais que o mercado nacional não atende à demanda biotecnológica ao longo do território. Assim, a busca por micro-organismos capazes de produzir eficientemente enzimas específicas o bastante para dispensar etapas exigentes de purificação, utilizando os lignocelulósicos como fonte indutora de crescimento, merece atenção no mundo todo (KULKARNI & SHENDYE & RAO, 1999).

2.3 Considerações Finais

Nos últimos anos as pectinases ganharam espaço em diversos segmentos industriais, tais como alimentos, farmacêutica, química e têxtil. Assim, a busca por micro-organismos capazes de produzir eficientemente enzimas pectinolíticas empregando meios compostos por resíduos agroindustriais é uma alternativa atraente, pois a aplicação destes materiais em bioprocessos torna-se importante sob o ponto de vista ambiental, reduzindo problemas relacionados ao seu manejo inadequado e consequentes danos ambientais, além disso, seu baixo custo, grande disponibilidade e abundância de nutrientes fazem dos mesmos excelentes substratos para a produção de vários biocompostos.

Neste contexto, este estudo objetivou a avaliação da potencialidade de aplicação de diferentes substratos na produção de enzimas pectinolíticas em fermentação submersa. Para tal, empregou-se a metodologia de planejamento de experimentos, visando o *screening* e os efeitos das variáveis da composição do meio na maximização da bioprodução de pectinases (exo-PG, PME e PMGL), bem como a caracterização das enzimas obtidas visando potencialidades de aplicação industrial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentadas as metodologias referentes à bioprodução das pectinases (pectina liase, pectinametilesterase, pectato liase, poligalacturonase e pectinaesterase) em meios complexo e com substratos agroindustriais, bem como a metodologia para a caracterização parcial das enzimas.

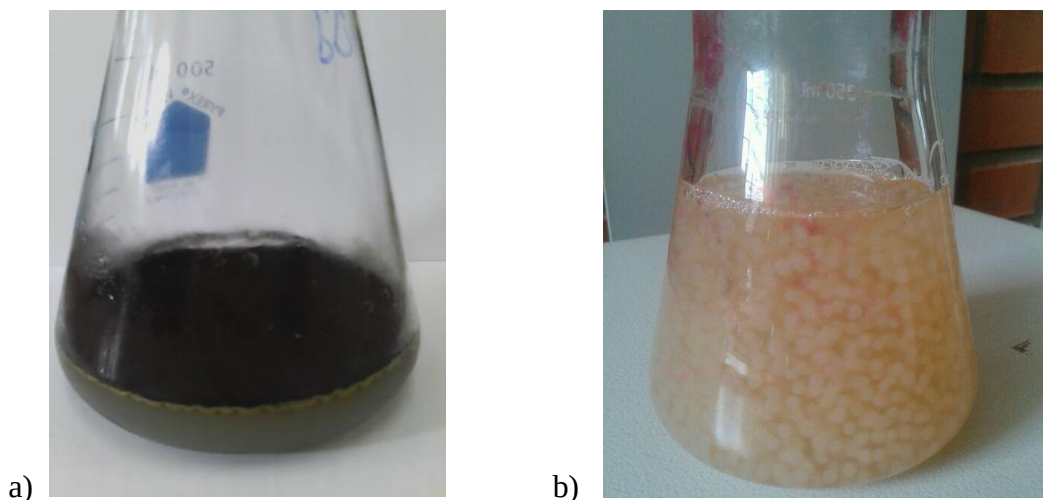
3.1. Micro-organismo

A cepa do fungo filamentoso de *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi cultivada em Potato Dextrose Ágar (PDA) durante 5 dias a 30°C, e então os esporos foram raspados com pérolas de porcelana devidamente esterelizadas e adicionadas nos tubos contendo solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v).

Para determinar o perfil do crescimento do micro-organismo foi traçada uma curva de crescimento. Aliquotas de 1 mL de suspensão de esporos de 5×10^6 esporos/mL do micro-organismo *A. niger* ATCC 9642 foram transferidas assepticamente para Erlenmeyers 250 mL, contendo 30 mL de meio Potato Dextrose (PD) incubados a 30°C, 180 rpm, e quantificando a massa celular durante 120 h.

Na determinação da massa celular por medida de peso seco após o crescimento do micro-organismo, em cada ponto de amostragem (Figura 4), todo o volume foi filtrado a vácuo (MARCONI Modelo MA 058) e a biomassa (*pellets*) retida no papel de filtro (Whatmam nº1) foi dessecada em estufa (ODONTO BRÁS MOD-EL-1.3) a 105°C até peso constante (aproximadamente 24 h).

Figura 4: a) Aspecto visual do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642. b) Aspectos dos pellets do fungo formados no processo fermentativo.



3.2. Bioprodução de pectinases em meio complexo

3.2.1 Cinética do tempo de reação na medida de atividade de pectina liase (PMGL)

O estudo da cinética do tempo de reação foi avaliado com a finalidade de verificar em qual tempo de reação se obtêm a maior atividade de pectina liase (PMGL), sendo avaliada no intervalo de tempos de 5 a 120 min em função da atividade da PMGL.

3.2.2. Efeito da concentração de esporos na produção de pectina liase e pectinametilesterase

A cepa do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi cultivada em PDA durante 7 dias a 28°C. Em seguida, a coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v), e pérolas de vidro estéreis adicionadas ao frasco, para uma melhor remoção dos esporos. A suspensão resultante foi armazenada a 4°C até sua utilização, o que não ultrapassava um tempo máximo de 15 dias. Para a contagem dos esporos, 1 mL da suspensão, retirada assepticamente, foi diluído de 10 a 10³ vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante da diluição 10⁻³ foi transferida para uma câmara de Neubauer (Inlab) para contagem dos esporos (Freire, 1996). Para a determinação da melhor concentração de esporos/mL para a produção de PMGL e PME foi realizado um estudo com diferentes concentrações de esporos/mL (5x10³, 5x10⁴, 5x10⁵, 5x10⁶, 5x10⁷ e 5x10⁸) no meio de bioprodução nos

tempos de 24, 48, 72 e 96 h, O meio de bioprodução utilizado constitui-se de 10 g/L de pectina cítrica, e 10 g/L extrato de levedura, pH inicial de 5,5 e acrescido de 1 mL de esporos nas diferentes concentrações, em 100 mL de meio. As condições de cultivo foram a 30°C, 180 rpm até 96 h de fermentação (UENOJO, 2003).

3.2.3. Screening de variáveis para a bioprodução de pectinases

Para estudar os efeitos da composição do meio complexo de cultura e de condições operacionais da bioprodução das pectinases (pectina liase - PMGL, pectato liase - PGL, pectina esterase - PE e pectinametilesterase - PME), foi utilizado um planejamento do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais.

A escolha, das variáveis de composição do meio complexo de bioprodução de pectinases foi baseada em dados da literatura (WANG *et al.*, 2009; MALLER 2008; SANTOS *et al.*, 2008; NITURE 2008; USTOK *et al.*, 2007; PATIL & DAYANAND 2006; PHUTELA *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2004; UENOJO 2003; DARTORA 2002; CASTILHO *et al.*, 2000; COURI *et al.*, 2000). As variáveis independentes de estudo e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 1. As variáveis independentes agitação (180 rpm), temperatura (30°C) e pH_{inicial} (5,5), foram fixadas e definidas a partir dos resultados obtidos por Gomes *et al.* 2011 de bioprodução de Exo-poligalacturonase. Como variável dependente (resposta) avaliou-se a atividade de PMGL, PME, PE e PGL. Para a definição do tempo de bioprodução acompanhou-se a medida de atividade em 24, 48, 72 e 96 h para as enzimas PMGL, PME, PE e PGL.

Tabela 1: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett & Burman para a bioprodução de pectinases.

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

*Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH_{inicial} 5,5 e 5x10⁶ esporos/mL.

3.2.4. Pectinametilesterase (PME)

3.2.4.1. Maximização e/ou Otimização da produção

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman realizou-se um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2) a fim de otimizar/maximizar o processo de produção. As variáveis independentes fixas foram temperatura (30°C), agitação (180 rpm), pH_{inicial} (5,5), concentração de esporos (5×10^6 esporos/mL) e tempo de bioprodução (72 h). As variáveis dependentes de estudo foram atividade da PME e pH.

Tabela 2: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para a produção de PME.

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
Pectina (g/L)	X ₁	22	32	42
Sulfato de magnésio (g/L)	X ₄	1	1,5	2
Fosfato de potássio (g/L)	X ₅	4	6	8

*Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH_{inicial} 5,5 e 72 h.

3.2.4.2. Efeito das concentrações dos sais e pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME

O experimento foi realizado objetivando determinar qual a melhor concentração de sais (NaCl, CaCl₂ e NaCl/CaCl₂) e pectina cítrica no meio reacional para proporcionar um incremento na atividade de PME.

As concentrações de sais testadas foram de 0,02 a 1 M e pectina cítrica fixada em 1 % (m/v). A associação dos sais foi realizada na proporção de 1:1 (m/v) em todas as concentrações. Posteriormente, avaliou-se o efeito da concentração de pectina cítrica (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 %) no meio reacional da medida de atividade da PME. O extrato enzimático bruto utilizado neste estudo foi o da condição maximizada de produção. A medida de atividade da PME foi conduzida segundo metodologia descrita por Hultin *et al.* (1966).

3.2.5. Pectina Liase (PMGL)

3.2.5.1. Maximização e/ou otimização da produção

Com base nos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman (Tabela 1) realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 , sendo que as variáveis estudadas foram: pectina cítrica, extrato de levedura e sulfato de ferro (Tabela 3). As variáveis independentes fixadas foram temperatura (30°C), agitação (180 rpm), pH_{inicial} (5,5), concentração de esporos (5×10^6 esporos/mL) e tempo de bioprodução (48 h).

Tabela 3: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para produção de PMGL.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Pectina cítrica (g/L)	X ₁	15,9	22,0	32,0	42,0	46,1
Extrato de levedura (g/L)	X ₃	13,2	20,0	30,0	40,0	46,8
Sulfato de Ferro (g/L)	X ₆	0,01	0,02	0,04	0,06	0,07

*Variáveis Independentes Fixas: 30 °C, 180 rpm, pH_{inicial} 5,5 e 48 h.

A partir dos resultados do planejamento fatorial completo 2^3 , os níveis das variáveis pectina cítrica e o extrato de levedura (Tabela 4) foram deslocados e fixou-se a concentração de sulfato de ferro (0,02g/L), bem como a temperatura (30°C), a agitação (180 rpm), o pH_{inicial} (5,5), a concentração de esporos (5×10^6 esporos/mL) e o tempo de bioprodução (48 h).

Tabela 4: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para produção de PMGL.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Pectina cítrica (g/L)	X ₁	15,9	22,0	32,0	42,0	46,1
Extrato de levedura (g/L)	X ₃	13,2	20,0	30,0	40,0	46,8

*Variáveis Independentes Fixas: Sulfato de Ferro: 0,02 g/L, 30 °C, 180 rpm, pH_{inicial} 5,5 e 48 h.

3.3. Bioprodução de pectinases com substratos agroindustriais

Para a bioprodução de pectinases (exo-PG, PMGL e PME) empregando meio de cultura a base de substratos agroindustriais, foi utilizado um planejamento fatorial do tipo 2^3 (*Screening Design*) de 17 ensaios com 3 pontos centrais a fim de avaliar os efeitos das variáveis na maximização da produção.

A escolha, das variáveis de composição do meio, foi baseada em dados da literatura (ALEXANDRINO *et al.*, 2007; UENOJO *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2004 ; THAKUR *et al.*, 1997; UHLIG, 1998). Como variáveis de estudo avaliou-se a diferentes concentrações de casca de laranja, água de maceração milho (AMM) e água de parboilização de arroz (APA), sendo que os níveis encontram-se descritos na Tabela 5. As variáveis independentes fixas foram temperatura (30°C), agitação (180 rpm), pH_{inicial} (5,5) e concentração de esporos (5×10^6 esporos/mL). Em paralelo realizaram determinações das atividades enzimáticas em diferentes tempos de bioprodução (24, 48, 72, 96 e 120 h).

Tabela 5: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 para bioprodução de pectinases.

Variáveis Independentes *	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Casca de Laranja (g/L)	X ₁	52,8	80	120	160	187,2
AMM (g/L)	X ₂	0	60	150	240	301,2
APA (g/L)	X ₃	48	150	300	450	552

*Variáveis Independentes Fixas: 30 °C; 180 rpm; pH_{inicial} 5,5 e 5×10^6 esporos/mL.

3.4. Estudo cinético da bioprodução de pectinases

O estudo cinético de bioprodução foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas empregando meio complexo e resíduos agroindustriais, tendo como objetivo avaliar a atividade da exo-PG, PME e PMGL o consumo de substratos (pectina – meio agroindustrial, Carbono Orgânico Total – meio complexo N₂, K, Mn, Mg e Fe), e o pH em função do tempo. As amostras foram coletadas periodicamente e em seguida filtradas com papel filtro (Whatmam n°1) e após realizadas as determinações analíticas.

3.5 Caracterização parcial dos extratos pectinolítico brutos

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

O extrato enzimático bruto utilizado no estudo de caracterização parcial das pectinases foi obtido a partir das condições experimentais maximizadas da produção de PMGL e PME, de meio complexo e de substratos agroindustriais e Exo-PG de substratos agroindustriais, respectivamente.

3.5.1. Avaliação da temperatura e pH ótimos

Para avaliar a temperatura e pH ótimos das enzimas Exo-PG, PMGL e PME empregou-se um planejamento fatorial completo 2^2 , sendo que os níveis das variáveis encontram-se descritos nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Para o ajuste dos valores de pH empregou-se soluções tampão de Tris-HCl 0,05 M e NaOH 0,01 M e para o controle da temperatura os extratos foram incubados em banho-maria (Nova Ética).

Tabela 6: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas Exo-PG e PMGL.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
pH	X ₇	3	3,5	4,5	5,5	6
Temperatura (°C)	X ₈	30	37	55	73	80

Tabela 7: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos da enzima PME.

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

3.5.2. Estabilidade térmica

A fim de determinar a estabilidade térmica dos extratos enzimáticos brutos da PMGL e PME estes foram estocados a altas (30, 40 e 50, 60 e 70°C) e baixas (4, -10 e -80°C) temperaturas. O extrato enzimático bruto da PME também foi submetido à temperatura de 100°C. As amostras foram coletadas periodicamente (em intervalos de 3 h) para avaliação das atividades enzimáticas. A estabilidade térmica foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática (PMGL e PME).

3.5.3. Estabilidade a diferentes condições de pH

A estabilidade da PMGL e PME frente ao pH foi realizada incubando-se os extratos enzimáticos bruto nas temperaturas ótimas, com o pH do meio reacional ajustado para 3; 3,4; 4,5; 5,5; 6, 7 e 8 com tampão Tris-HCl 0,05 M. para a PMGL e nos pHs de 5, 7, 9 e 11 com NaOH 0,01 M para a PME, respectivamente. As amostras foram coletadas periodicamente (em intervalos de 3 h) para avaliação das atividades enzimáticas de PMGL e PME. A estabilidade frente ao pH foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática (PMGL e PME).

3.5.4. Energia de ativação (E_a)

A energia de ativação foi estimada a partir da declividade da reta obtida no gráfico contendo valores do logaritmo neperiano ($\ln$) da atividade enzimática inicial (A_0) nos ensaios contra o inverso da temperatura em graus Kelvin (°K). Obtidas as regressões lineares entre estes valores, foi calculada a energia de ativação (Lehninger, Nelson & Cox, 1995), que estabeleceu que essa declividade é proporcional a energia de ativação ($-K = -E_a/R$), onde K é a declividade da reta e R a constante dos gases. Essa constante foi determinada para as amostras até que atingiram queda de 50 % nas suas atividades residuais no período analisado.

3.6. Determinações analíticas

3.6.1. Atividade de Pectina liase (PMGL)

A atividade da pectina liase foi determinada segundo método de Ayers *et al.* (1966), descrito por Pitt (1988), sendo determinados os produtos insaturados finais da

degradação da pectina e do ácido tiobarbitúrico. A mistura de reação consistiu-se em 5,0 mL da solução de pectina 1,0 % em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5; 1,0 mL da solução de CaCl_2 0,01 M; 1,0 mL do extrato bruto enzimático e 3,0 mL de água destilada. Após a incubação por 2 h a 30°C, foi adicionado 0,6 mL de uma solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9 % em seguida 0,6 mL de NaOH 0,5 M. As proteínas precipitadas do substrato não consumidas foram removidas por centrifugação a 3000xg por 10 min. O sobrenadante foi adicionado à mistura de 3,0 mL do ácido tiobarbitúrico 0,04 M; 1,5 mL de HCl 0,1 M e 0,5 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria por 30 min, resfriada e medida a absorbância à 550 nm. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorbância à 550 nm, nas condições do ensaio (PITT,1988).

3.6.2. Atividade de Pectinametilesterase (PME)

A atividade da pectinametilesterase (PME) foi determinada segundo Hultin *et al.* (1966). Adicionou-se 1 mL do extrato enzimático a 30 mL de pectina cítrica 1 % em NaCl 0,2 M. O pH da solução foi mantido em torno de 7,0, por 10 min, com NaOH 0,01 N. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 nmol de NaOH nmol/minmL, nas condições do ensaio.

3.6.3. Atividade da Pectato Liase (PGL)

A atividade da PGL foi determinada pela formação de produtos insaturados a partir de ácido poligalacturônico (PGA) em espectrofotômetro a 230 nm. A mistura de reação-padrão constitui-se de 3 mL de PGA (Sigma), 1,0% (p/v) em tampão Tris/HCl 0,1 M, pH 8,5 e 0,5 mL do sobrenadante do extrato bruto enzimático. A reação foi realizada a 25°C por um período de 40 min. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 40 min de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, interrompendo-se, assim, a reação. Uma unidade de atividade de PGL foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μmol de produtos insaturados por mililitro da cultura por minuto, utilizando-se para cálculo o coeficiente de absorção molar do produto insaturado como sendo de $5.200 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (MORAN *et al.*, 1968).

3.6.4. Atividade da Pectinaesterase (PE)

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

3.6.5. Atividade de Poligalacturorase (PG)

A atividade da poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalisílico (DNS), proposto por MILLER (1959). Inicialmente, preparou-se 1000 µL de substrato (solução 0,5 % de pectina cítrica (Sigma) em tampão acetato de sódio pH 5,5) e incubou-se a 40°C por 15 min para estabilização de temperatura. A seguir, 500 µL de extrato enzimático foram adicionados ao substrato e a reação incubada a 40°C por um período de reação de 6 min. Após a adição de 1 mL de solução de DNS, a mistura foi mantida em ebulição por 8 min para formação de cor, resfriada em banho de gelo e adicionados 8,0 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para estabilização de cor.

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

3.6.6. pH

Para monitoramento do pH dos meios de cultivo e do acompanhamento durante a bioprodução de pectinases (Exo-PG, PMGL, PME, PE e PGL) foi utilizado potenciômetro (DMPH-2, Digimed), onde inicialmente se procedeu a calibração do eletrodo em pH 7,0, 4,0 e 10,0, posteriormente realizando a leitura das amostras.

3.6.7. Carbono orgânico total (COT)

O teor de Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado para caracterizar os substratos agroindustriais líquidos e para o acompanhamento da cinética de consumo de substratos em meios de bioprodução complexos, pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680°C e detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH. As amostras foram diluídas 100 vezes em água ultrapura (Sistema Mili-Q®, Millipore), antes da leitura no equipamento.

3.6.8. Macro e Microminerais

O teor de nitrogênio total foi determinado nos meios de bioprodução de pectinases pelo método de Kjeldahl (VELP DK-20 e UDK-126D), segundo metodologia da AOAC (1995).

O magnésio, potássio, manganês e ferro foram determinados nos substratos agroindústrias, visando a caracterização, e o monitoramento do consumo dos substratos, 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 na determinação de Mg, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrões na proporção de 1 % (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrão.

3.6.9. Pectina

O procedimento para extração de pectina do meio composto por substratos agroindustriais de bioprodução foi realizado a partir da suspensão filtrada. As amostras de meio suspenso (4 g) foram dissolvidas em 200 mL de água destilada. As extrações foram realizadas à temperatura constante (97°C) sob condições de concentração de ácido cítrico (7,0 %), por tempo de 1 h. Após extração ácida, as amostras foram resfriadas a 4°C por 2 h, filtradas em tecido de poliéster, sendo descartado o sobrenadante. Ao filtrado, contendo pectina, foi adicionado álcool etílico (95 %) na proporção 1:2 (uma parte de solução de pectina e duas partes de álcool). Após 1h, houve a separação da pectina na forma de precipitado, sendo separada por filtração. A pectina obtida foi seca em estufa de secagem a 55 °C até peso constante (MUNHOZ *et al.*, 2010) e expressa em % de pectina extraída.

3.7. Tratamentos estatísticos

Os resultados da produção de pectinases e caracterização parcial (pH e temperatura ótimos) foram tratados estatisticamente mediante metodologia de planejamento de experimentos e os relacionados a caracterização dos substratos, efeitos da concentração de sais e pectina na medida de atividade da PME, da concentração de esporos, do tempo da medida da atividade, foram tratados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey das cinéticas (bioprodução e consumo de substratos) e da avaliação da estabilidade térmica e a diferentes pHs foram tratados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA), seguido de comparação das médias pelo teste de Tukey, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, com nível de significância de 95 % de confiança.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussão referentes ao estudo da maximização e/ou otimização da bioprodução de pectinases (exo-poligalacturonase, pectina liase, pectinametilesterase, pectato liase e pectinaesterase) por *A. niger* ATCC 9642 em meio complexo e a base de substratos agroindustriais (água de maceração de milho e de parboilização de arroz e casca de laranja), bem como a caracterização parcial (pH e temperaturas ótimos, estabilidade térmica e ao pH) dos extratos brutos pectinolíticos obtidos.

4.1. Bioprodução de pectinases

4.1.1. Definição do tempo de reação na medida de atividade de PMGL

A fim de definir o tempo de reação para a determinação da atividade da PMGL realizou-se um estudo cinético. A Tabela 8 apresenta a atividade de pectina liase em função do tempo de reação. Observa-se que houve diferença significativa a nível de 95 % de confiança nos tempos de reação, sendo que definiu-se o tempo reação de 20 min para a medida da atividade por não diferir significativamente ($p < 0,05$) dos tempos maiores de 20 minutos.

Tabela 8: Atividade da pectina liase (U/mL) em função do tempo de reação.

<i>Tempo (min)</i>	<i>*Atividade de PMGL (U/mL)</i>
5	21,98 ± 0,22 ^e
7,5	24,71 ± 0,27 ^d
10	26,87 ± 0,07 ^c
15	26,33 ± 0,25 ^c
20	28,22 ± 0,18 ^{ab}
25	27,46 ± 0,16 ^b
35	27,73 ± 0,12 ^b
40	28,48 ± 0,15 ^{ab}
50	28,77 ± 0,09 ^a
70	27,46 ± 0,25 ^b
80	27,56 ± 0,10 ^b
100	28,71 ± 0,05 ^a
120	28,52 ± 0,25 ^{ab}

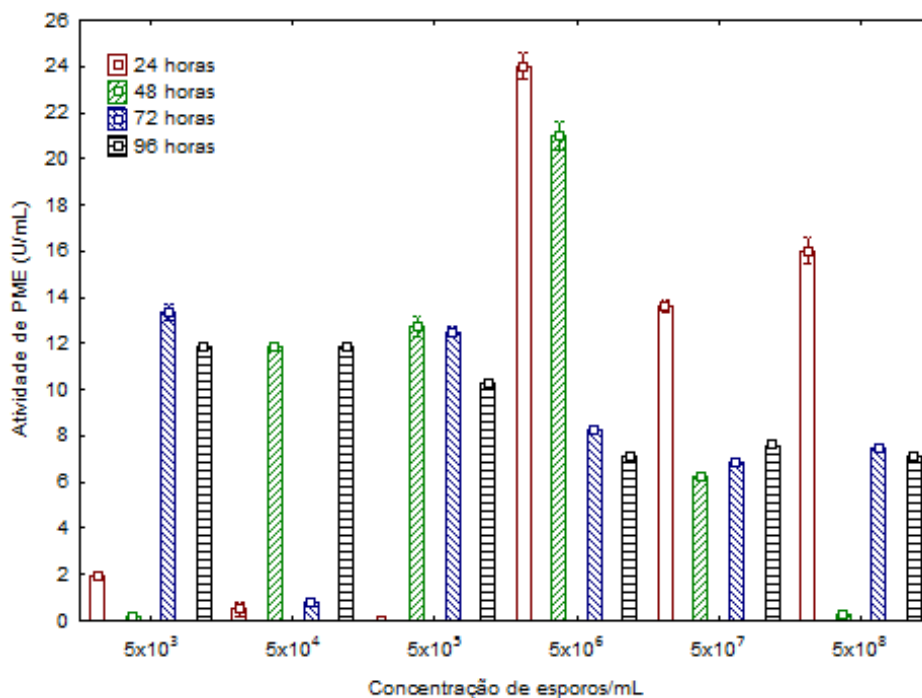
*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais não diferem estatisticamente à nível de 5 % (Teste Tukey).

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

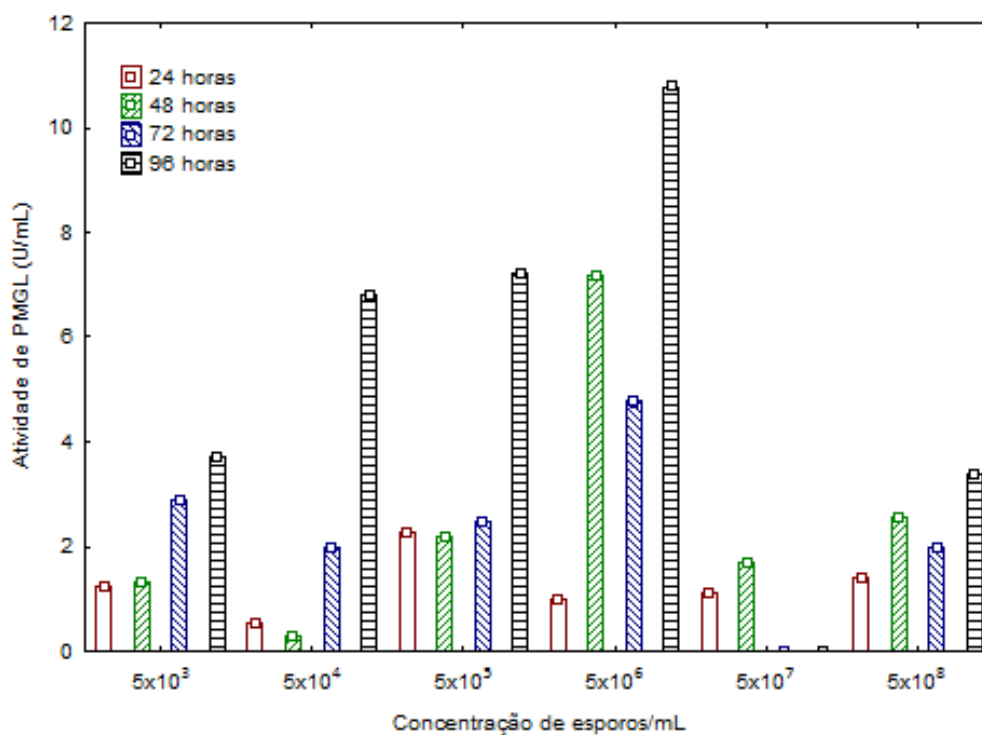
4.1.2. Efeito da concentração de esporos em diferentes tempos de bioprodução

A concentração de esporos, numa solução para inoculo, mostra-se muito importante, uma vez que a quantidade de esporos viáveis inoculados poderá influenciar na bioprodução de pectinases. Para comprovar esta hipótese e verificar se há uma quantidade ideal de esporos para o inoculo na produção de enzimas pectinolíticas, analisou-se a concentração da solução de esporos de 5×10^3 a 5×10^8 esporos/mL para o *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio líquido a base de pectina cítrica, sendo que a Figura 5 apresenta os resultados de atividade de pectinametilesterase 5a (PME) e pectina liase 5b (PMGL) em função da concentração de esporos e em diferentes períodos de bioprodução, respectivamente. Observou-se que a maior atividade enzimática de PME (24 U/mL em 24 h) e PMGL (10,8 U/mL em 96 h) foram obtidas na concentração de esporos de 5×10^6 esporos/mL. Desta forma, definiu-se a concentração de esporos em 5×10^6 esporos/mL de *Aspergillus niger* ATCC 9642 para os ensaios de bioprodução de pectinases. A mesma concentração de esporos foi obtida no estudo com exo-PG (GOMES *et al.*, 2011).

Figura 5: Produção de PME (a) e PMGL (b) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 em diferentes tempos de bioprodução, respectivamente.



(a)



(b)

4.1.3. Screening de variáveis para a bioprodução de pectinases em meio complexo

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento do tipo Plackett-Burman com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade de pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinaesterase (PE) e pectato liase (PGL) produzidas por *A. niger* ATCC 9642 em meio complexo.

Pectinametilesterase (PME)

De acordo com a Tabela 9, observa-se que a máxima atividade de PME foi de 3,2 U/mL (Ensaio 5), onde o meio de cultivo apresentava as maiores concentrações de pectina cítrica (22 g/L), fosfato de potássio (4,0 g/L) e sulfato de magnésio (1 g/L). O tempo de bioprodução para enzima PME foi fixado em 72 h, em função da máxima atividade verificada na cinética de bioprodução da PME (Tabela 50, Apêndice I).

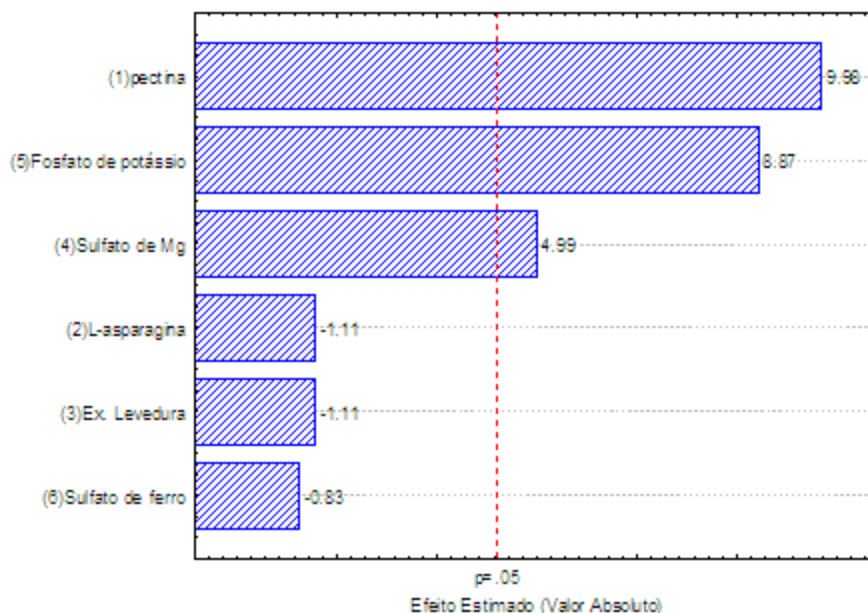
A Figura 6 demonstra o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a PME. Verifica-se que a pectina, o fosfato de potássio e o sulfato de magnésio apresentaram efeitos significativos positivos ($p < 0,05$), o que significa que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para +1, possivelmente ocasionará um aumento na atividade enzimática. As variáveis L-asparagina, extrato de levedura e sulfato de ferro não apresentaram efeito ($p < 0,05$) e como no nível -1, as concentrações destas variáveis foram nulas, sendo excluídas das etapas subsequentes de bioprodução.

Tabela 9: Matriz do planejamento tipo Plackett-Burman valores reais e codificados e respostas em produção das enzimas pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL), pectinesterase (PE) e pectato liase (PGL).

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis Independentes*</i>						<i>Resposta de atividade pectinolítica (U/mL)</i>			
	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>X₃</i>	<i>X₄</i>	<i>X₅</i>	<i>X₆</i>	<i>PME</i> (72 h)	<i>PMGL</i> (48 h)	<i>PE</i> (72 h)	<i>PGL</i> (48 h)
1	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1,80	13,76	0,0003	0,016
2	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	2,00	1,79	0,0025	0
3	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	-1 (0)	1,50	0	0,0043	0,036
4	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	2,00	17,1	0,0043	0,128
5	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	3,20	1,98	0,0077	0
6	1 (22)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	2,00	11,26	0,0171	0,346
7	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	0,60	1,49	0,4300	0
8	-1 (2)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	1,60	0,77	0,4285	0
9	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	1 (0,02)	2,30	0	0,0085	0
10	1 (22)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	2,50	2,59	0,0171	0
11	-1 (2)	1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,02)	0,20	0	0,0017	0
12	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	0,10	1,14	0,0001	0
13	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	2,20	7,26	0,0085	0,033
14	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	2,10	7,8	0,0085	0,061
15	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	2,80	7,53	0,0077	0

*X₁= Pectina (g/L), X₂= L-Asparagina (g/L), X₃= Extrato de levedura (g/L), X₄= Sulfato de magnésio (g/L), X₅= Fosfato de potássio (g/L), X₆= Sulfato de Ferro (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5, 5x10⁶ esporos/mL.

Figura 6: Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no Plackett-Burman para a PME.

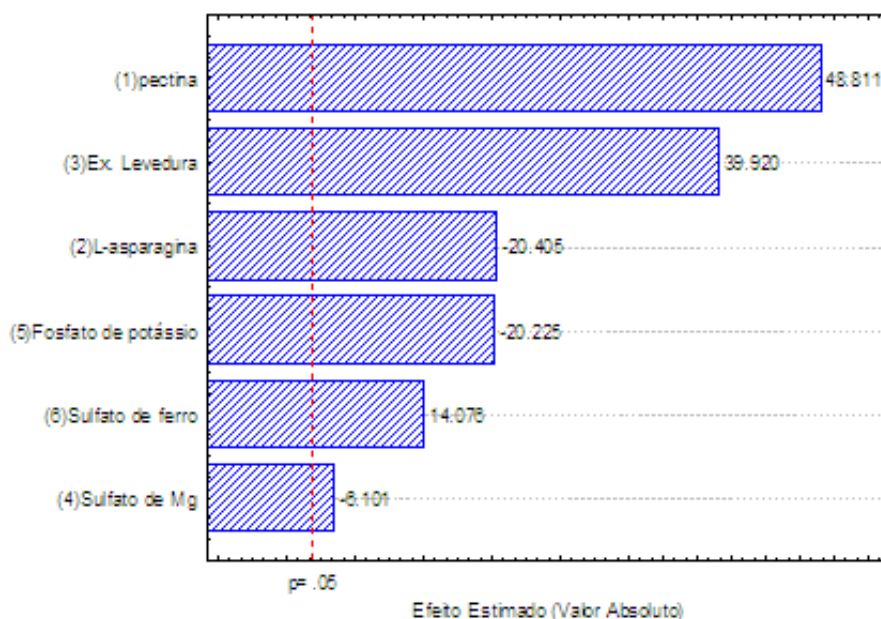


Pectina Liase (PMGL)

Para a pectina liase a máxima atividade foi de 17,1 U/mL (Ensaio 4), onde o meio de cultivo apresentava as concentrações de 22 g/L de pectina cítrica, 20 g/L de extrato de levedura, 1,0 g/L sulfato de magnésio e 0,02 g/L sulfato de ferro. O tempo de bioprodução para enzima PMGL foi fixado em 48 h a partir da máxima atividade obtida (Tabela 51, Apêndice II).

A Figura 7 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis na bioprodução de PMGL. Verifica-se que as variáveis pectina cítrica, extrato de levedura e sulfato de ferro tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95%, demonstrando que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para +1, possivelmente ocasionará um aumento na atividade enzimática de PMGL. Entretanto, as variáveis L-asparagina, fosfato de potássio e sulfato de magnésio apresentaram efeito negativo ($p < 0,05$) e como no nível -1, a concentração foi nula, estas variáveis foram excluídas das próximas etapas de bioprodução de PMGL, logo os níveis das variáveis pectina, extrato de levedura e sulfato de ferro foram deslocados para valores superiores, a fim de maximizar a produção de PMGL.

Figura 7: Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no Plackett–Burman para a produção PMGL.



Pectato Liase (PGL) e Pectina Esterase (PE)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, as enzimas PGL e PE apresentaram as máximas atividades enzimáticas de 0,35 e 0,43 U/mL nos tempos de 48 e 72 h, respectivamente. Os valores de atividade dos demais tempos de bioprodução avaliados encontram-se nas Tabelas 52 e 53, Apêndices III e IV, respectivamente. Estes valores de atividades de PGL e PE são considerados baixos quando comparados a resultados encontrados na literatura, assim não justificando ensaios de maximização e/ou otimização da bioprodução destas enzimas. Martin *et al.* (2006) em seu estudo de produção de pectinases por *Penicillium* sp. EGC5 e *Moniella* sp. 9SB em fermentação semi-sólida (FSS) de resíduos agrícolas verificou que as duas linhagens não produziram quantidades de pectinaesterase (PE) detectáveis durante todo o período fermentativo (360 h).

Santi (2005) estudando a produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais verificou que quando o meio continha casca de laranja (1 %) obteve atividade de PE de 0,87 U/mL (72 h, 170 rpm e 28°C) e ao utilizar pectina cítrica a atividade foi de 0,78 U/mL e com casca de limão uma atividade de 0,68 U/mL.

Lima (2006) estudando a produção de pectinases por *Aspergillus tubingensis* LUC40F4C1 empregando meio contendo 0,5% de pectina cítrica, pH inicial 2,5, 30°C, agitação de 150 rpm e concentração de esporos de 10^6 esporos/mL, obteve atividade de PE de 2,38 U/mL em 48 h, a partir deste período até 72 h houve redução de 21,43% da

atividade de PE registrando 1,87 U/mL. Porém em 96 h a PE aumentou cerca de 100% (3,76 U/mL).

Damak *et al.* (2011), estudando a purificação e caracterização de pectato liase produzida pelo fungo *Penicillium occitanis* obtiveram a máxima atividade de PGL de 343 U/mL usando como substrato pectina cítrica. Ouattara *et al.* (2011) em estudo de identificação molecular e produção de pectato liase por cepas de *Bacillus* envolvidas na fermentação do cacau obtiveram atividade máxima de pectato liase igual a 22,63 U/mg pela cepa identificada como *Bacillus subtilis* (FJ483514) e atividade mínima de pectato liase igual a 0,109 U/mg pela cepa *B. cereus* (DQ339685).

4.1.4. Maximização da produção de pectinases

4.1.4.1. Pectinametilesterase (PME)

A partir dos resultados obtidos através no planejamento tipo Plackett-Burman (Tabela 9 e Figura 6), as faixas das variáveis foram ampliadas, sendo que a Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 e as respostas em atividade de PME (U/mL) e pH. Observa-se que a máxima atividade foi de 9,0 U/mL (Ensaio 4), onde o meio complexo era constituído de 42 g/L de pectina cítrica, 1 g/L de sulfato de magnésio e 8 g/L de fosfato de potássio, nas condições de 180 rpm, 30 °C, 72 h de bioprodução, pH_{inicial} de 5,5 e concentração de esporos de 5×10^6 esporos/mL.

Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores codificados e reais) e resposta em produção de pectinametilesterase e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Resposta	
	X_1	X_4	X_5	PME (U/mL)	pH
1	-1 (22)	-1 (1)	-1 (4)	3,90	3,14
2	1 (42)	-1 (1)	-1 (4)	6,70	3,24
3	-1 (22)	-1 (1)	1 (8)	8,60	2,73
4	1 (42)	-1 (1)	1 (8)	9,00	3,04
5	-1 (22)	1 (2)	-1 (4)	5,90	2,87
6	1 (42)	1 (2)	-1 (4)	6,90	3,05
7	-1 (22)	1 (2)	1 (8)	7,60	2,86
8	1 (42)	1 (2)	1 (8)	6,80	3,25
9	0 (32)	0 (1,5)	0 (6)	7,10	2,94
10	0 (32)	0 (1,5)	0 (6)	6,60	3,07
11	0 (32)	0 (1,5)	0 (6)	6,30	2,76

* X_1 = Pectina (g/L), X_4 = Sulfato de magnésio (g/L), X_5 = Fosfato de potássio (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, 72 h e pH_{inicial}=5,5 e 5×10^6 esporos/mL.

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectinametilesterase. As concentrações de fosfato de potássio e a interação sulfato de magnésio e fosfato de potássio tiveram uma influência significativa ($p < 0,05$) positiva e negativa, respectivamente, sobre a atividade da pectinametilesterase. Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 12).

Tabela 11: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2^3 para atividade de pectinametilesterase.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	6,77	0,166	40,60	0,00060
(1)Pectina(L)	0,050	0,102	0,490	0,673
(2)Sulfato de Magnésio(L)	0,25	0,102	2,45	0,134
(3)Fosfato de potássio(L)*	1,45	0,102	14,21	0,005
1L.2L	0,001	0,102	0,001	1,00
1L.3L	-0,15	0,102	-1,46	0,279
2L.3L*	-1,050	0,102	-10,20	0,009

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

Tabela 12: Análise de variância para a bioprodução de PME do planejamento fatorial 2^3 .

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	26,44	7	3,78	12,78
Resíduo	0,890	3	0,30	
Falta de Ajuste	0,720	1		
Erro Puro	0,167	2		
Total	27,33	10		

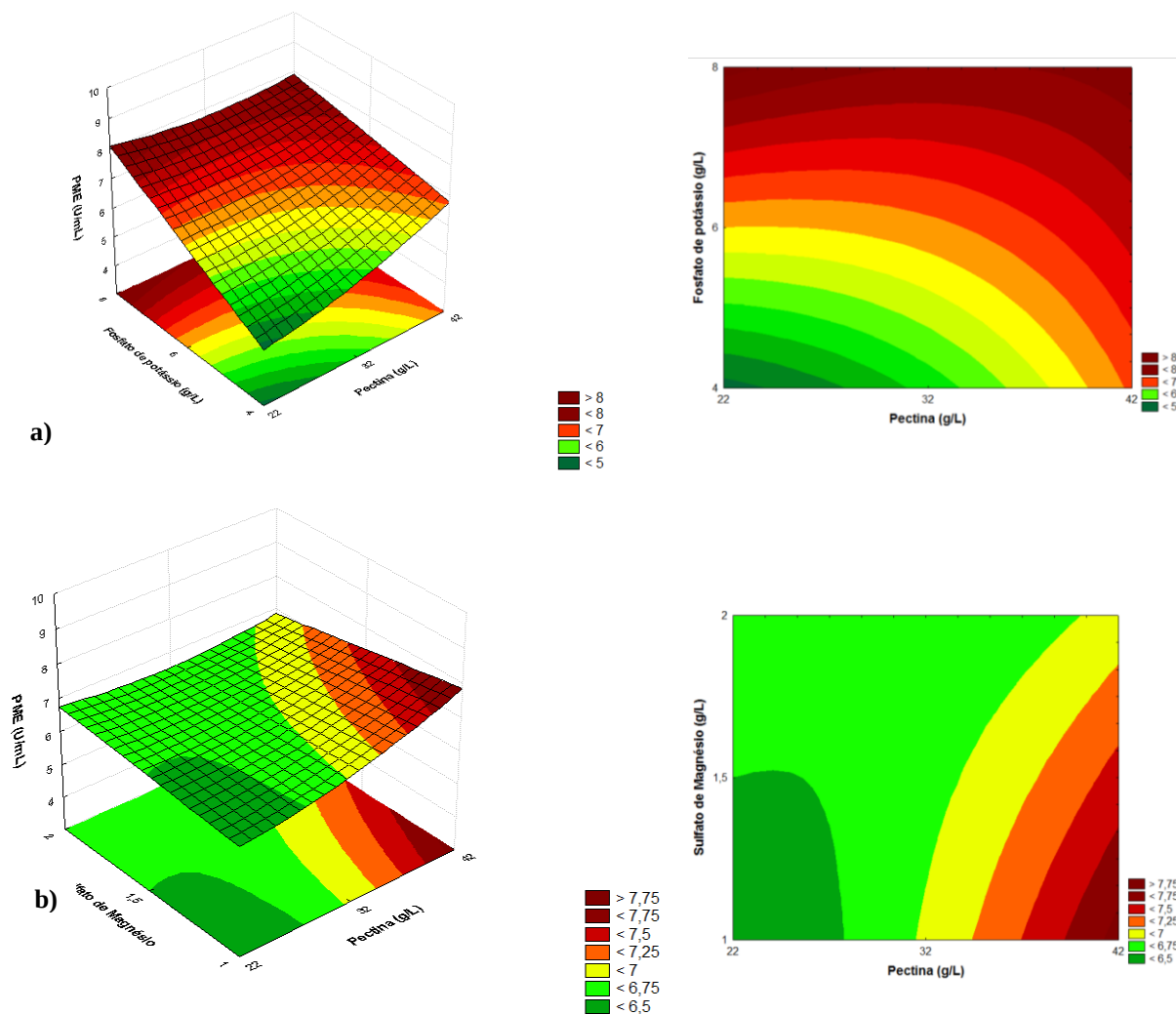
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,10$

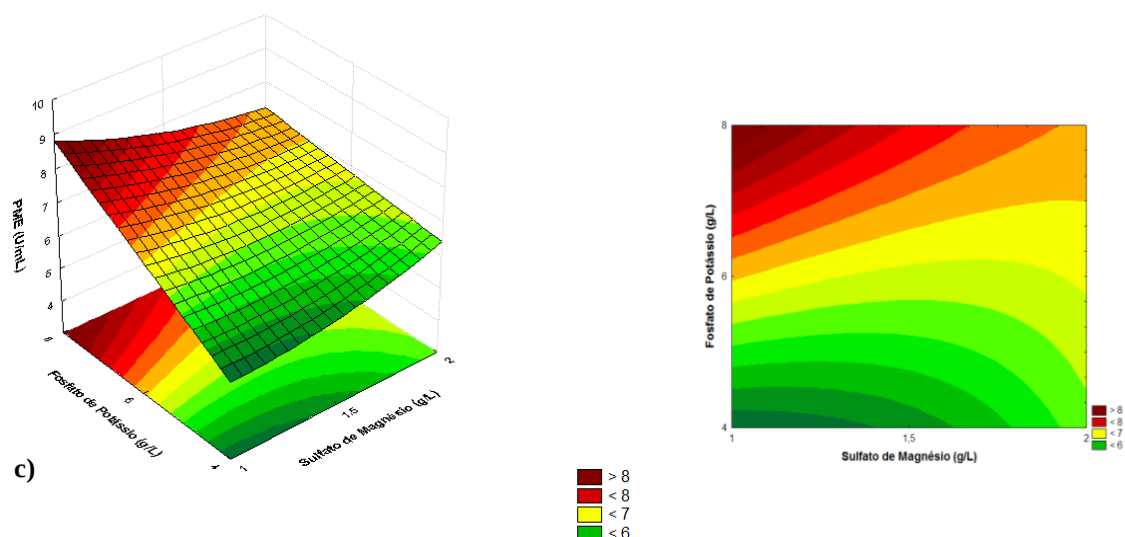
A Equação 1 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve a atividade da pectinametilesterase em função da variável fosfato de potássio e a interação de sulfato de magnésio e fosfato de potássio, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,98 e F calculado 3,11 vezes maiores que o valor do F tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 8 demonstrando que a máxima produção de PME se dará em concentrações próximas a 42 g/L de pectina cítrica e 10 g/L de fosfato de potássio e 1 g/L de sulfato de magnésio.

$$\text{PME} = 6,76 + 1,45 \cdot X_5 - 1,05 \cdot X_4 X_5 \quad (1)$$

Onde, PME = Atividade de pectinametilesterase (U/mL); X_4 = Sulfato de Magnésio (g/L), X_5 = Fosfato de Potássio (g/L).

Figura 8: Superfícies de resposta e curvas de contorno em função da concentração de pectina e fosfato de potássio (a), sulfato de magnésio e pectina (b) e fosfato de potássio e sulfato de magnésio (c), e para bioprodução de PME (U/mL), respectivamente.





Para confirmar estes resultados, realizou-se um experimento em triplicata variando a concentração de fosfato de potássio de 8, 10, 12 e 16 g/L e fixando as concentrações de pectina cítrica em 42 g/L e sulfato de magnésio em 1 g/L a 180 rpm, 30 °C, 72 h e pH_{inicial} 5,5. A Tabela 13 apresenta os resultados da atividade de PME (U/mL) em função da concentração de fosfato de potássio. Verifica-se que a máxima produção de PME foi de 9,46 U/mL onde utilizou-se 16 g/L de fosfato de potássio, porém não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das concentrações de 10 e 12 g/L de fosfato de potássio. Neste sentido, a concentração de fosfato de potássio foi fixada em 10 g/L, visando diminuir custo do substrato.

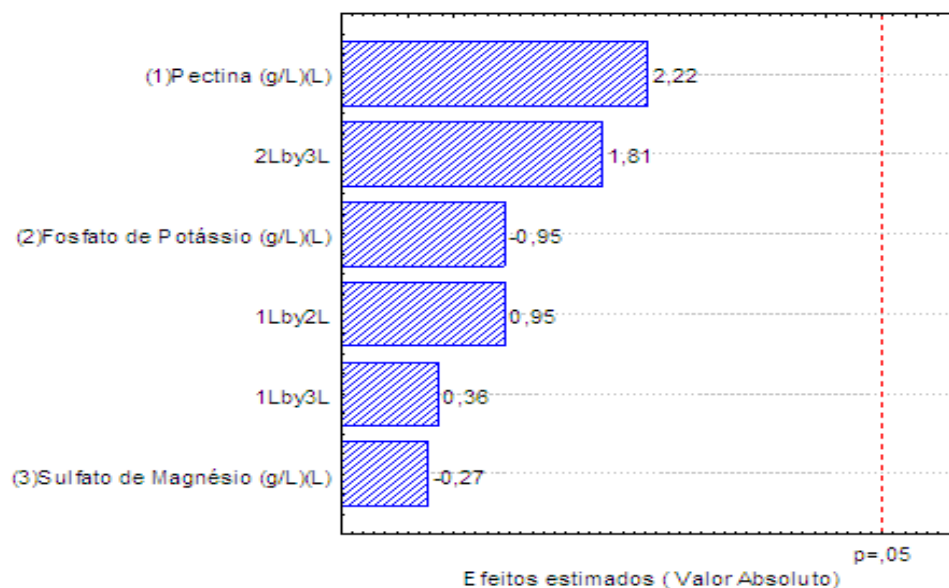
Tabela 13: Atividade de PME (U/mL) em função da concentração de fosfato de potássio.

<i>Ensaio</i>	<i>Fosfato de Potássio</i> (g/L)	<i>Atividade de PME*</i> (U/mL)
1	8	7,56± 0,85 ^b
2	10	9,06± 0,40 ^a
3	12	8,88± 0,39 ^a
4	16	9,46± 0,05 ^a

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

A Figura 9 apresenta o gráfico de Pareto com as variáveis estimadas do planejamento fatorial 2^3 em função do pH, onde verifica-se que nenhuma das variáveis estudadas influenciaram no pH (2,76 a 3,24).

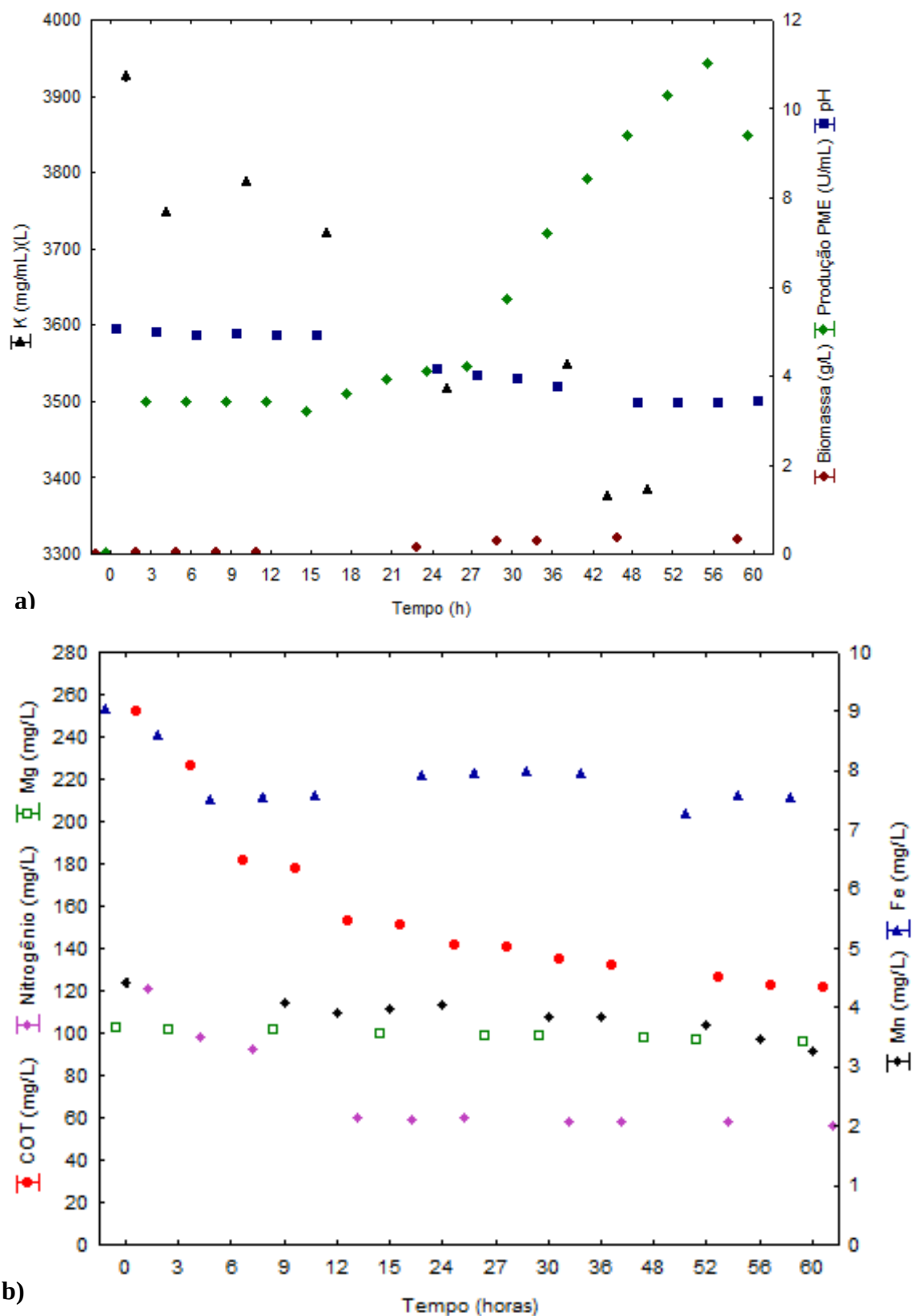
Figura 9: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^3 para o pH.



4.1.4.2. Estudo cinético

O estudo cinético na bioprodução foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas (42 g/L de pectina cítrica, 1,0 g/L de sulfato de magnésio, 10 g/L de fosfato de potássio) em frascos agitados (30°C, 180 rpm e pH_{inicial} de 5,5), tendo por objetivo avaliar a atividade de PME (U/mL) em função do tempo de bioprodução (h), o consumo de substrato (COT, N₂, K, Mg, Mn, Fe), crescimento celular e pH, conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10: (a) Estudo cinético na bioprodução de PME (U/mL), produção de biomassa (g/L), evolução do pH e consumo de K (mg/L) em função do tempo (h); (b) Cinética do consumo dos substratos COT, N₂, Mg, Mn e Fe (mg/L) em função do tempo (h).



De acordo com a Figura 10 (a) verifica-se que a máxima atividade de PME foi de 9,4 U/mL obtida em 56 h de bioprodução, estando relacionado com a queda do pH, o qual permaneceu estável nas primeiras 24 h, com ligeira queda no intervalo das 24 a 27 h, chegando a uma redução de aproximadamente 33 % após 56 h, sendo superior a encontrada por Zeni *et al.*, 2012, no valor de 4 U/mL produzida pelo fungo *Penicillium brasilianum*. Ressalta-se que a atividade enzimática da PME (9,4 U/mL) obtida pelo fungo filamentoso *A. niger* ATCC 9642, no presente estudo, é superior ao relatado por Aquino (2008) em preparado enzimático comercial (Pectinex AR), que apresentou atividade de 3,58 U/mL, sendo que para outros preparados comerciais como a Pectinex Ultra SP-L, Pectinex AR, Ultrazym AFP-L, Biopectinase CCM e Viscozyme L, a atividade da PME foi de 18,90; 29,98; 18,25 e 61,26 U/mL, respectivamente. No entanto, sendo superior a atividade (1,47 U/mL) obtida dos resíduos industriais da polpa do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr) - cv. Pérola (CARVALHO, 2007).

Para os resultados obtidos com a biomassa, os valores mostraram-se baixos ao longo do tempo cinético, chegando ao final com 0,34g/L. O pH é considerado um importante parâmetro envolvido na produção e manutenção de pectinases, pois alterações nos valores de pH podem influenciar a atividade enzimática por meio de modificações conformacionais na molécula, proporcionando assim alterações no seu sítio ativo, resultando na redução ou no aumento da sua afinidade com o substrato (GARZÓN & HOURS, 1992). Geocze (1994) também sugere que uma das razões pela qual a produção e atividade de enzimas pécnicas variam com o pH, também está relacionada com a estabilidade do pH de cada enzima pectinolítica.

Em relação ao consumo dos substratos (Figura 10 b), observa-se que o carbono orgânico total (COT) nas primeiras 12 h apresentou uma redução de aproximadamente 39 % em relação valor inicial, após este período seu consumo foi lento e progressivo, chegando ao tempo de 60 h com um consumo total de 52 %.

O consumo de potássio foi gradativo, apresentando uma queda mais acentuada no intervalo de tempo de 13 a 27 h tendo uma redução total de aproximadamente 16 % em 60 h.

O consumo de magnésio apresentou-se praticamente estável, tendo uma variação de 6 % durante todo o processo fermentativo, sendo relativamente baixo em relação aos demais substratos. Verificando o comportamento do substrato manganês, observa-se que em relação ao valor inicial (4,41 mg/L), ocorreu um consumo total de aproximadamente 26 % . Em observação ao nitrogênio, o consumo foi de cerca de 53 % nas primeiras 13 h, e após permaneceu praticamente estável até às 60 h, com consumo total de 58 %. Em relação ao substrato ferro, constatou-se que o maior consumo foi nas primeiras 9 h, e após manteve-se estável (7,6 – 7,54 mg/L).

4.1.4.3. Efeito da concentração de sais e de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade

Para o estudo do efeito das concentrações de sais no meio reacional da medida de atividade da PME, foi utilizado o extrato enzimático bruto obtido nas condições maximizadas de produção. As concentrações dos sais NaCl, CaCl₂ e a mistura NaCl/CaCl₂ variaram de 0,02 a 1 M. A Tabela 14 apresenta as concentrações dos sais NaCl, CaCl₂ e a mistura de NaCl/CaCl₂ no meio reacional da medida de atividade da PME.

Tabela 14: Atividade da pectinametilesterase em diferentes concentrações de sais NaCl, CaCl₂ e a interação NaCl/CaCl₂.

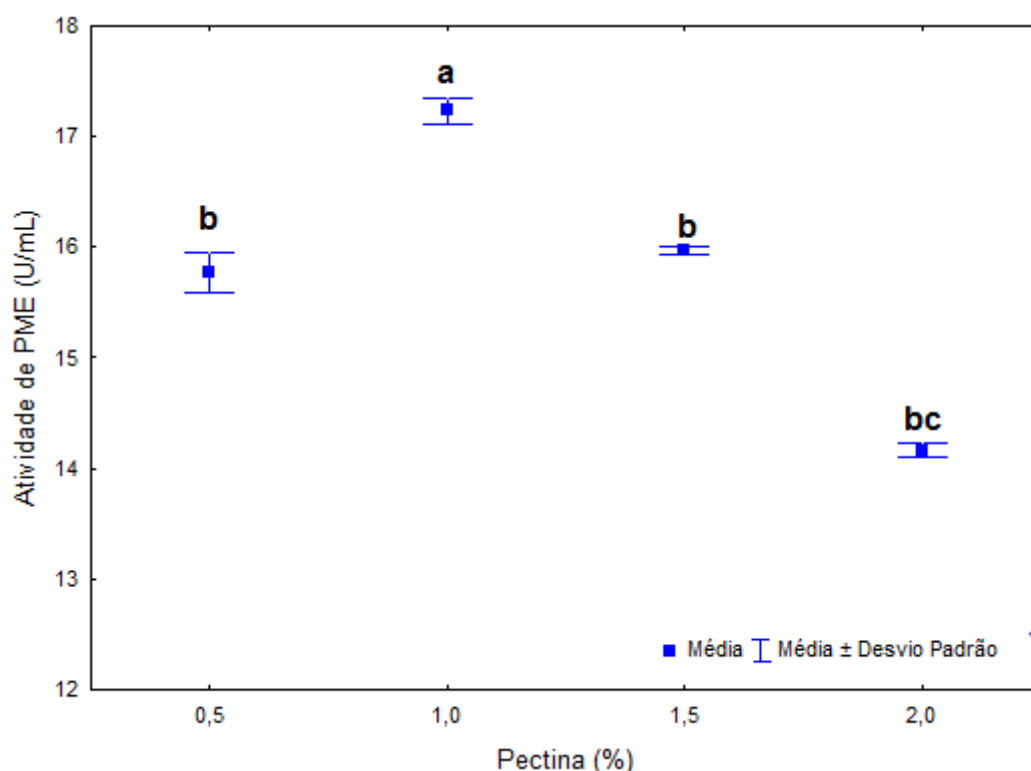
Concentrações de Sais (M)	NaCl	CaCl ₂	NaCl+CaCl ₂
0,02	10,40±0,50 ^{CC}	11,45±0,05 ^{FA}	11,16±0,11 ^{hB}
0,04	11,16±0,11 ^{bB}	12,23±0,25 ^{eA}	12,16±0,20 ^{FA}
0,06	11,06±0,11 ^{bB}	12,30±0,20 ^{eA}	12,35±0,05 ^{FA}
0,08	10,60±0,17 ^{CC}	12,85±0,05 ^{eA}	11,70±0,10 ^{gB}
0,1	11,06±0,23 ^{bB}	12,50±0,17 ^{eA}	12,73±0,15 ^{FA}
0,15	11,23±0,15 ^{bC}	14,93±0,25 ^{DA}	13,96±0,15 ^{EB}
0,2	11,10±0,17 ^{bC}	15,60±0,20 ^{CA}	14,93±0,15 ^{DB}
0,25	11,65±0,15 ^{bC}	14,40±0,17 ^{DB}	15,50±0,17 ^{CA}
0,3	11,23±0,11 ^{bC}	15,63±0,28 ^{CA}	14,70±0,20 ^{DB}
0,4	11,50±0,00 ^{bC}	15,93±0,25 ^{CA}	15,43±0,05 ^{CB}
0,5	11,06±0,20 ^{bC}	16,80±0,30 ^{BA}	16,16±0,20 ^{BB}
0,75	12,36±0,23 ^{AC}	17,70±0,20 ^{AA}	17,16±0,05 ^{AB}
1,0	10,13±0,15 ^{CC}	14,23±0,20 ^{DA}	13,10±0,10 ^{FB}

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

De acordo com a Tabela 14, verifica-se que quando foi utilizado o 0,75 M de CaCl₂ foi obtida a maior atividade de PME, de 17,7 U/mL, representando um aumento de .aproximadamente 47 % na atividade quando comparado com o valor obtido na maximização da bioprodução. Ao empregar a associação dos sais NaCl e CaCl₂, na concentração de 0,75 M) a maior atividade obtida foi de 17,16 U/mL. Já para NaCl (0,75 M) foi obtida uma atividade máxima de 12,36 U/mL. Com base nestes resultados passou-se a realizar a medida de atividade da PME com adição de CaCl₂ 0,75 M.

A Figura 11 apresenta os resultados referentes a medida da atividade de PME em função da concentração de pectina cítrica (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 %). A solução de CaCl₂ 0,75 M foi usado no meio reacional e nesta condição avaliou-se os efeitos da variação de pectina.

Figura 11: Atividade da PME em função de diferentes concentrações de pectina cítrica no meio reacional de medida.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 11, observa-se que a maior atividade foi obtida na concentração de 1 % de pectina cítrica no meio reacional da medida de atividade da PME. Os resultados demonstram que em valores superiores a 1,0 % de pectina cítrica pode ocorrer inibição por excesso de substrato. A partir destes resultados a medida de atividade da PME foi realizada com 1 % de pectina e CaCl_2 0,75 M.

Cardello & Lourenço (1992) avaliaram a utilização dos sais NaCl e CaCl_2 e 0,125 % de pectina no meio reacional e verificaram que os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 0,15 e 0,04 M em NaCl e CaCl_2 , respectivamente, com valores de atividade aproximadamente 6 U/mL para os dois sais estudados. Já quando analisaram a associação dos sais, NaCl e CaCl_2 e 0,5 % de pectina cítrica, variando a molaridade, verificaram que a atividade foi de aproximadamente 9 U/mL para todas as molaridades estudadas (0,04 a 0,5 M), isto pode ser explicado por existir a presença do NaCl_2 no tampão extrator onde este foi imprescindível para solubilizar a PME já que a enzima encontra-se ligada ionicamente a parede celular.

4.1.4.4. Caracterização parcial do extrato bruto de PME

Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto de PME produzido em condições maximizadas (42 g/L de pectina cítrica, 1,0 g/L de sulfato de magnésio, 10 g/L de fosfato de potássio, 5×10^6 esporos/mL, 30°C, 56 horas, pH_{Inicial} 5,5 e 180 rpm) foram definidos baseados em um planejamento de experimentos. A Tabela 15 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais), bem como os resultados da atividade enzimática da pectinametilesterase, na qual observa-se que a maior atividade de PME foi de 26,40 U/mL (Ensaio 6) com pH 11 e temperatura de 55°C.

A Tabela 16 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectinametilesterase a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que as variáveis estudadas influenciaram na atividade da PME, sendo que pH e temperatura apresentaram efeito positivo, porém a interação pH e temperatura foi negativa. Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância - ANOVA (Tabela 17).

Tabela 15: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática de pectinametilesterase em função de temperatura e pH.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Respostas
	pH	Temperatura (°C)	PME (U/mL)
1	-1 (5,54)	-1 (37)	7,20
2	1 (9,8)	-1 (37)	19,20
3	-1 (5,54)	1 (73)	10,40
4	1 (9,8)	1 (73)	19,50
5	-1,41 (5)	0 (55)	6,50
6	1,41 (11)	0 (55)	26,40
7	0 (7)	-1,41 (30)	14,70
8	0 (7)	1,41 (80)	15,30
9	0 (7)	0 (55)	14,50
10	0 (7)	0 (55)	14,40
11	0 (7)	0 (55)	14,20

Tabela 16: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de PME em função de temperatura e pH.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	14,37	0,088	162,97	0,000038
(1)pH (L)*	6,16	0,054	113,95	0,000077
pH (Q)*	0,628	0,064	9,72	0,010410
(2) Temperatura(L)*	0,545	0,054	10,07	0,009710
Temperatura(Q)	-0,102	0,064	-0,379	0,175950
1L.2L*	-0,725	0,076	-9,49	0,010917

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 2 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PME em função das variáveis analisadas (Temperatura e pH), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 17), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,98 e o F calculado de 8 vezes superior que o valor tabelado, o qual permitiu, também, a construção da superfícies de resposta e/ou curva de contorno apresentadas na Figura 12.

Tabela 17: Análise de variância para a atividade de PME do planejamento fatorial completo 2² em função de temperatura e pH.

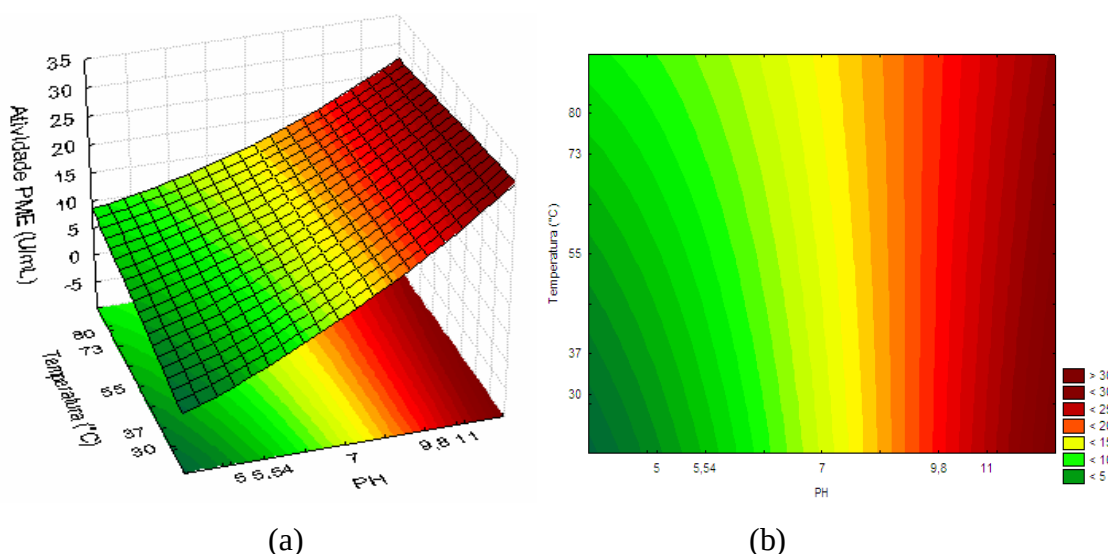
<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	310,09	4	77,52	36,40
Resíduo	12,78	6	2,13	
Falta de Ajuste	12,72	4		
Erro Puro	0,04	2		
Total	322,86	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; F_{tab} = 4,53

$$\text{PME (U/mL)} = 14,373 + 6,163.\text{pH} + 0,627.(\text{pH})^2 + 0,544.T - 0,72.(\text{pH}).(T) \quad (2)$$

Onde: PME = Atividade de pectinametilsterase (U/mL); T = Temperatura (°C)

Figura 12: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PME (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH.



De acordo com a Figura 12, verifica-se uma ampla faixa de temperatura (30 a 80°C) e pH na faixa superior 11, porém com máxima atividade de PME de 26 U/mL a 55°C e pH 11.

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

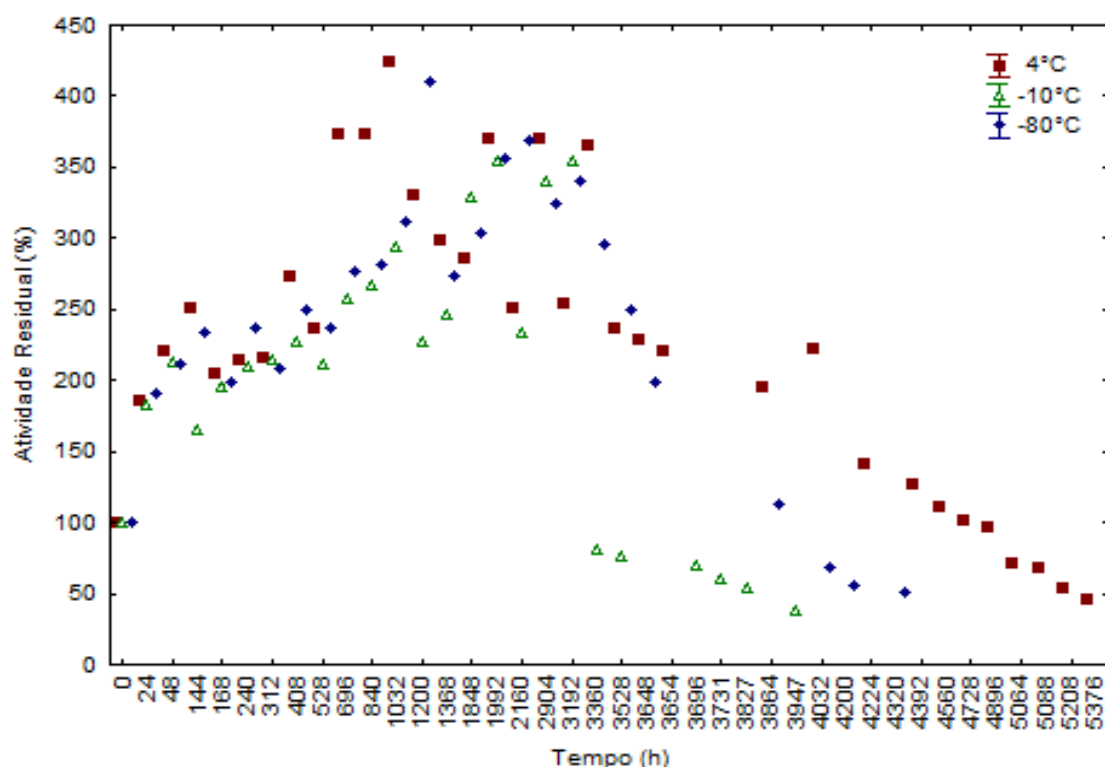
Ueda *et al.* (1982) verificaram que o pH ótimo de ação de quatro enzimas do complexo pectinolítico é diferente, variando de 4,0 a 8,5. Os autores identificaram, de forma análoga, que cada enzima estudada é estável em diferentes faixas de pH e que os processos de produção devem ser conduzidos de forma a privilegiar a estabilidade da enzima de interesse, em detrimento das demais.

Avaliação da estabilidade térmica

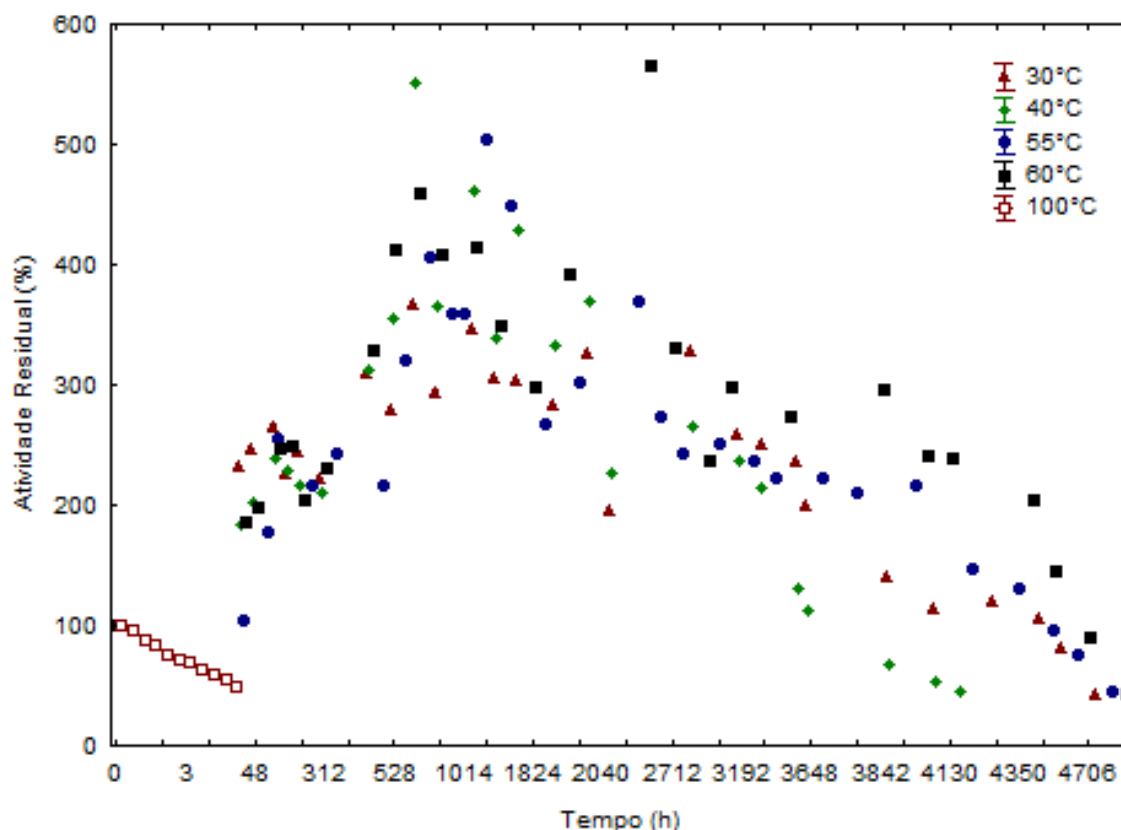
A avaliação da estabilidade térmica (Figura 13) do extrato enzimático bruto da PME foi realizada estocagem em diferentes temperaturas (-80, -10, 4, 30, 40, 50, 60, 70 e 100°C), acompanhando o comportamento em função do tempo. Verifica-se que em baixas temperaturas (Figura 13 a) de -80, -10 e 4°C, o extrato enzimático bruto quando estocado a temperatura de 4°C apresentou um incremento de aproximadamente 4 vezes em relação a atividade inicial, e chegando a uma atividade residual de aproximadamente de 50,77 %) m 5376 h. Para as temperaturas de -10 e -80°C os comportamentos foram semelhantes, porém na temperatura de estocagem de -80°C observou-se que permaneceu por um período de 895 h a mais do que se refere a tempo de estocagem a -10°C.

De acordo com a Figura 13 (b) verifica-se que na temperatura de 100°C houve inativação da enzima em 5 h. Enquanto que para as temperaturas de 55 e 60°C, tiveram comportamento muito semelhante atingindo aproximadamente 50 % da atividade residual em 4706 h de tempo de estocagem.

Figura 13: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PME submetido a baixas (4,-10 e -80°C) e a altas temperaturas (100, 60, 55, 40 e 30°C).



(a)



(b)

De modo a avaliar a estabilidade térmica da pectinametilesterase obtido por *A. niger* ATCC 9642, os dados obtidos experimentalmente foram plotados como $\ln (A/A_0)$ como uma função do tempo. Seguindo este procedimento, a constante de desativação térmica (K_d) foi obtido para cada temperatura e apresentada na Tabela 18. Uma representação gráfica de $\ln (K_d)$ como uma função de $1/T$ (K) foi usada para calcular a energia de activação (E_d) para a reação de desativação, obtido o valor de 17,77 kJ/mol por *A. niger* ATCC 9642. De acordo com a Tabela 20, a temperatura mais estável foi de 55°C, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 35,05 h. Estudos realizados por Thakur *et al.* (2010) determinaram a meia-vida para poligalacturonase de *Mucor circinelloides* de 2 horas a 50°C. Aminzadeh *et al.* (2006) indicaram em seus estudos que a poligalacturonase do fungo *Tetracoccusporium* sp. exibiu meia-vida de 63 minutos a 60°C.

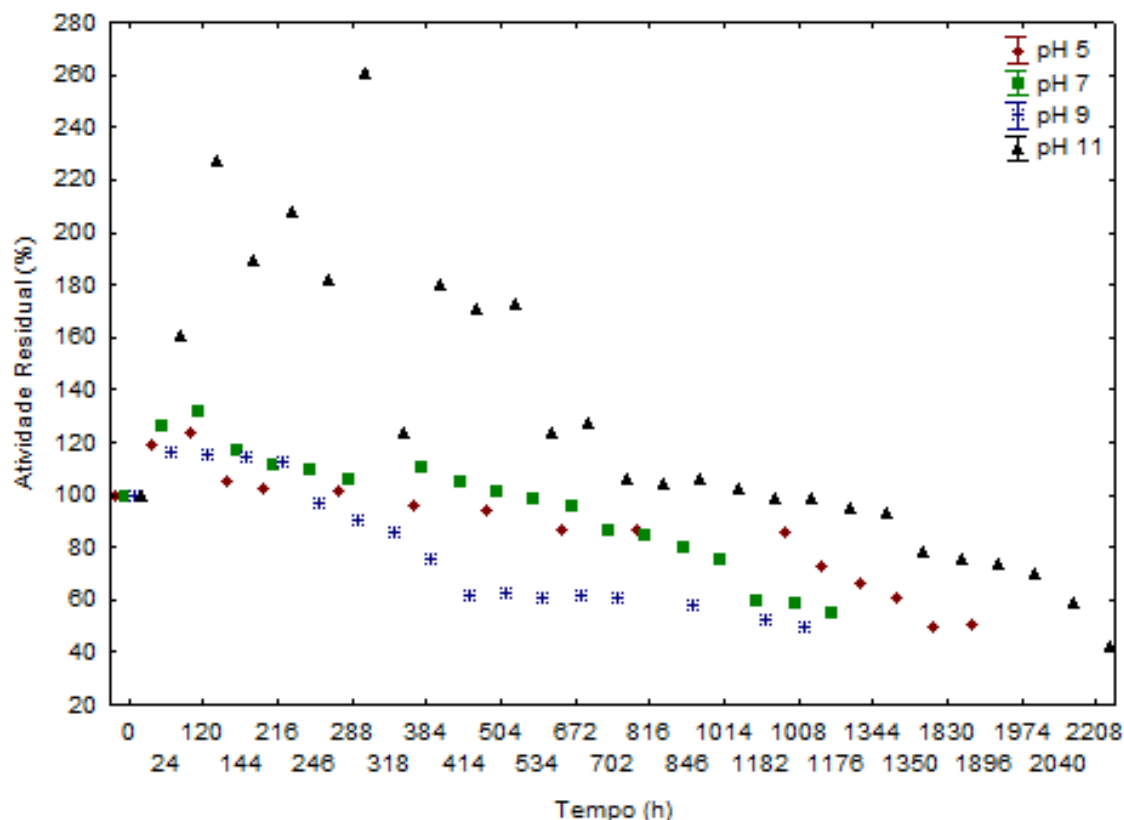
Bastos (2012) caracterizou as enzimas PME, PL, exo-PG e endo-PG obtidas por *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries quanto a sua estabilidade frente o pH (4,0 a 8,0), temperatura (30 a 70°C) e tempo de incubação (43 a 107 horas). A estabilidade das enzimas foi máxima em temperatura em torno de 25 a 35°C, sendo possível reter aproximadamente 5% da atividade enzimática inicial.

Tabela 18: Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da PME obtido pelo *A. niger* ATCC 9642.

Temperature (°C)	K (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
30	199,4	31,00
40	0,138	28,13
55	0,061	35,05
60	0,076	28,13
100	0,069	31,00

A avaliação da estabilidade do extrato enzimático bruto da PME foi realizada incubando esta a diferentes valores de pH (5, 7, 9 e 11), acompanhando o comportamento em função do tempo (Figura 14). Verifica-se que a atividade residual manteve-se mais estável em pH 11, com atividade residual de aproximadamente de 50 % até 2040 h. Bastos (2012) observou que para a PME, o pH influenciou negativamente, mas em pH alcalino (8,0) associado a uma temperatura de até 30°C, manteve-se cerca de 80% da atividade inicial, observando assim que estas enzimas podem ser aplicadas em processamentos industriais ácidos e básicos, com temperatura de até 30°C e duração de até 107 horas, sem reduzir seu potencial de ação.

Figura 14: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PME submetido a diferentes pH 5, 7, 9 e 11.



Catharina (2013) submeteu o caldo enzimático a pH de 2,0, 3,0 e 4,0, houve preservação de 80% da atividade enzimática, em relação ao valor inicial, até 96 h, sendo o pH 3,0, entre os testados e assim como relatado por Mohsen *et al.* (2009), a melhor condição, com manutenção de cerca de 93% do valor inicial. Observou-se um aumento acentuado da atividade enzimática nas condições de pH de 4,0 e 5,0, nas primeiras 16h de incubação, possivelmente por estas condições terem favorecido o crescimento celular, o que foi constatado visualmente.

Estes resultados corroboram com os estudos de Mohsen *et al.* (2009), que verificaram que em pH 7,0 e 8,0, apenas 54% e 17% da atividade inicial foi mantida, respectivamente, após 3,5 horas de incubação.

A grande maioria dos relatos encontrados na literatura mostram que a estabilidade das enzimas frente ao pH e temperatura é estudada através do método considerado como tradicional, ou seja, a estabilidade térmica é estudada em condições de pH constante e vice-versa. Tem sido relatado que a maioria das pectinases fúngicas apresentam estabilidade em condições ácidas de pH (GUMANDI; KUMAR, 2006) e foram suscetíveis a desnaturação acima de 50°C (GALIOTOU-PANAYOTOU *et al.* 1997). Além disso, a maioria têm a faixa de pH ótimo de 3,5-5,5 e faixa de temperatura ideal de 30-50°C.

4.1.5. Pectina Liase (PMGL)

De acordo com os resultados obtidos com o planejamento do tipo Plackett–Burman, as faixas das variáveis foram ampliadas, sendo que a Tabela 19 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 e as respostas em atividade enzimática de PMGL e pH.

Tabela 19: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em produção de pectina liase e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas	
	X_1	X_3	X_6	PMGL (U/mL)	pH
1	-1 (22)	-1 (20)	-1 (0,02)	12,59	4,34
2	1 (42)	-1 (20)	-1 (0,02)	16,53	4,04
3	-1 (22)	1 (40)	-1 (0,02)	18,28	4,6
4	1 (42)	1 (40)	-1 (0,02)	12,73	4,31
5	-1 (22)	-1 (20)	1 (0,06)	10,79	4,3
6	1 (42)	-1 (20)	1 (0,06)	15,51	4,04
7	-1 (22)	1 (40)	1 (0,06)	19,74	4,62
8	1 (42)	1 (40)	1 (0,06)	15,21	4,33
9	0 (32)	0 (30)	0 (0,04)	21,24	4,29
10	0 (32)	0 (30)	0 (0,04)	20,89	4,3
11	0 (32)	0 (30)	0 (0,04)	20,87	4,32
12	-1,68 (15,9)	0 (30)	0 (0,04)	12,05	4,73
13	1,68 (46,1)	0 (30)	0 (0,04)	15,69	4,17
14	0 (32)	-1,68 (13,2)	0 (0,04)	7,91	4,04
15	0 (32)	1,68 (46,8)	0 (0,04)	20,35	4,49
16	0 (32)	0 (30)	-1,68 (0,01)	14,47	4,3
17	0 (32)	0 (30)	1,68 (0,07)	13,99	4,37

* X_1 = Pectina (g/L), X_3 = Extrato de levedura (g/L), X_6 = Sulfato de Ferro (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5 e 48 h.

De acordo com a Tabela 19, verifica-se que a máxima produção de PMGL foi de 21,24 U/mL (Ensaio 9) com 32 g/L pectina cítrica, 30 g/L de extrato de levedura e 0,04 g/L de sulfato de ferro.

A Tabela 20 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t (2), para atividade de pectina liase (PMGL). Verifica-se que todas as variáveis apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$). Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (Tabela 21).

Tabela 20: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t (2) do planejamento fatorial completo 2³ para atividade de PMGL.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	20,89	0,119	174,31	0,00003
(1) Pectina (L)*	0,345	0,056	6,12	0,02565
Pectina (Q)*	-2,18	0,062	-35,19	0,00080
(2) Extrato de Levedura (L) *	2,30	0,056	40,90	0,00059
Extrato de Levedura (Q) *	-2,09	0,062	-33,72	0,00087
(3) Sulfato de ferro (L)	0,02	0,056	0,408	0,72281
Sulfato de ferro (Q)*	-2,06	0,062	-33,14	0,00090
1L x 2L*	-2,34	0,073	-31,84	0,00098
1L x 3L	0,22	0,073	3,06	0,09234
2L x 3L*	0,84	0,073	11,49	0,00749

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

Tabela 21: Análise de variância para a bioprodução de PMGL do planejamento fatorial 2³.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	218,00	7	31,21	8,69
Resíduo	32,00	9	3,59	
Falta de Ajuste	32,24	7		
Erro Puro	0,087	2		
Total	250,77	16		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; F_{tab,95%}=3,29

A Equação 3 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, em função das variáveis analisadas (pectina, extrato de levedura e sulfato de ferro), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 21), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,93 e o F calculado de 2,64 vezes maior que o valor tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curva de contorno, apresentadas na Figura 15.

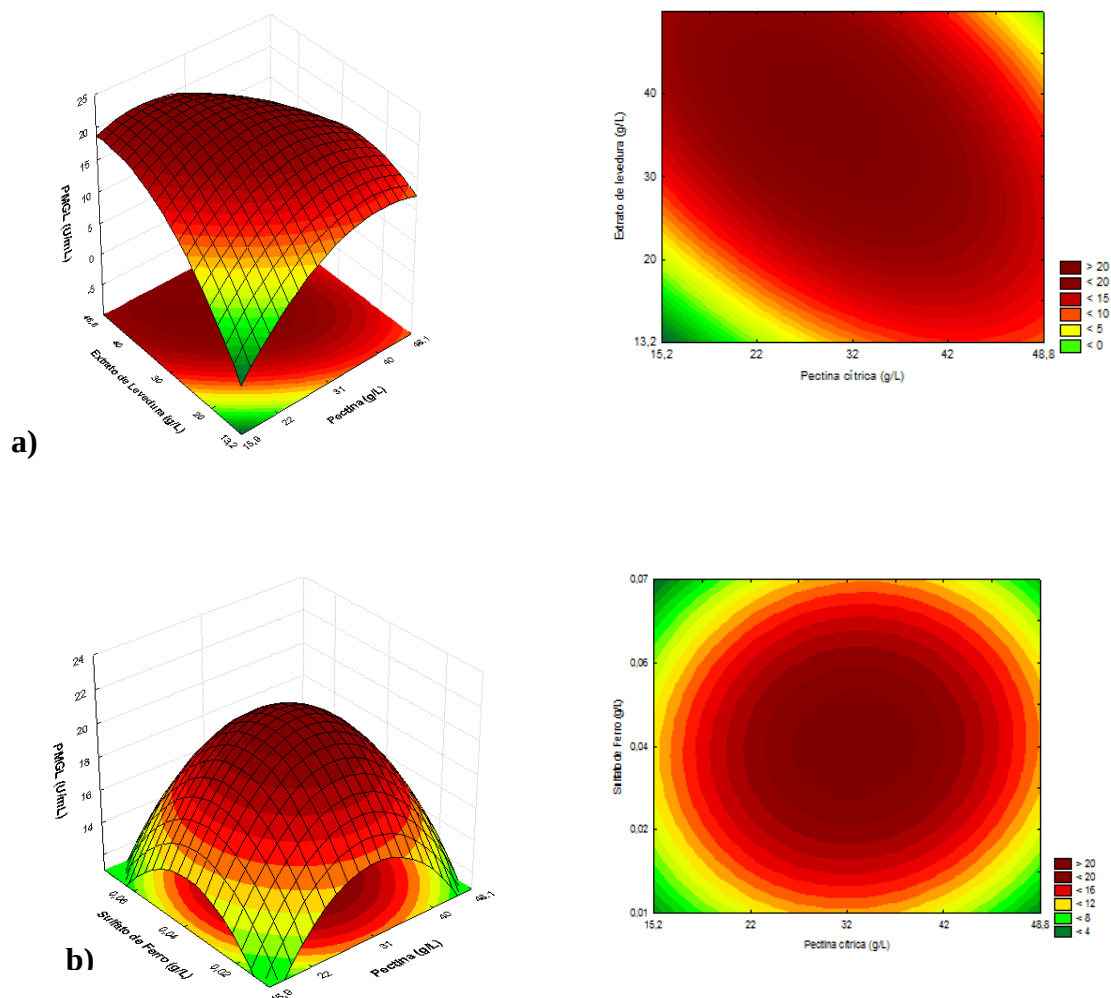
$$\text{PMGL} = 20,898 + 0,345X_1 - 2,184X_1^2 + 2,304X_3 - 2,092X_3^2 - 2,057X_6^2 - 2,34X_1X_3 + 0,84 X_3 X_6 \quad (3)$$

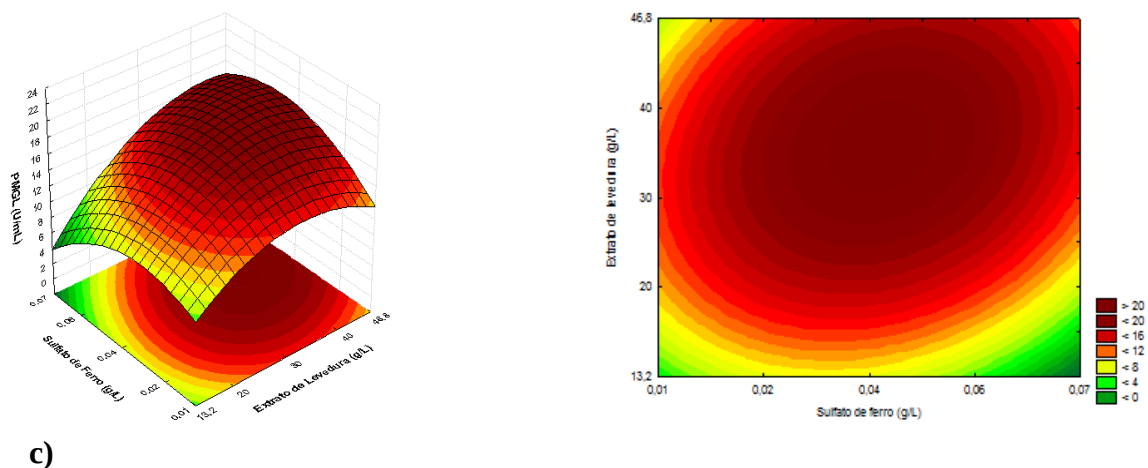
Onde: PMGL = Atividade de Pectina Liase (U/mL); X₁ = Pectina cítrica (g/L); X₃ = Extrato de levedura (g/L); X₆= Sulfato de ferro (g/L).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 19, com a máxima atividade de pectina liase (21,24 U/mL) (Figura 15), na região próxima a 32g/L pectina cítrica, 30 g/L extrato de

levedura e 0,04g/L sulfato de ferro os quais caracterizam a maximização da bioprodução de PMGL. Em relação à atividade inicial que foi de 17,1 U/mL, houve um incremento de 80 % na bioprodução.

Figura 15: Superfícies de resposta e curvas de contorno para bioprodução de PMGL (U/mL) em função da concentração de extrato de levedura e pectina (a), concentração de pectina e sulfato de ferro (b) e concentração de sulfato de ferro e extrato de levedura (c), respectivamente.



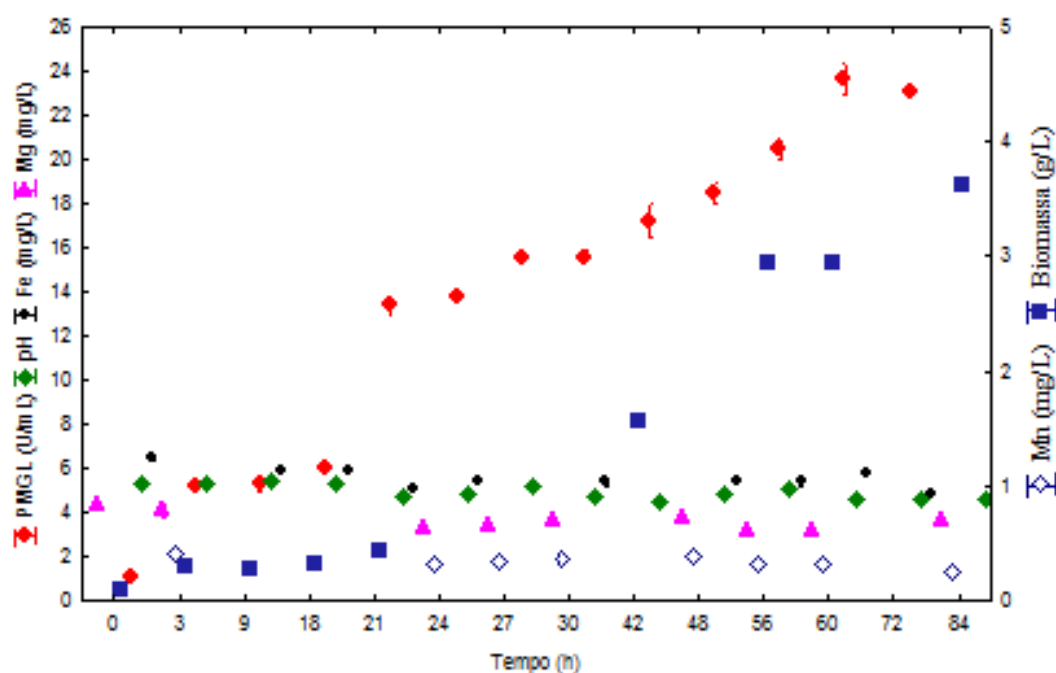


c)

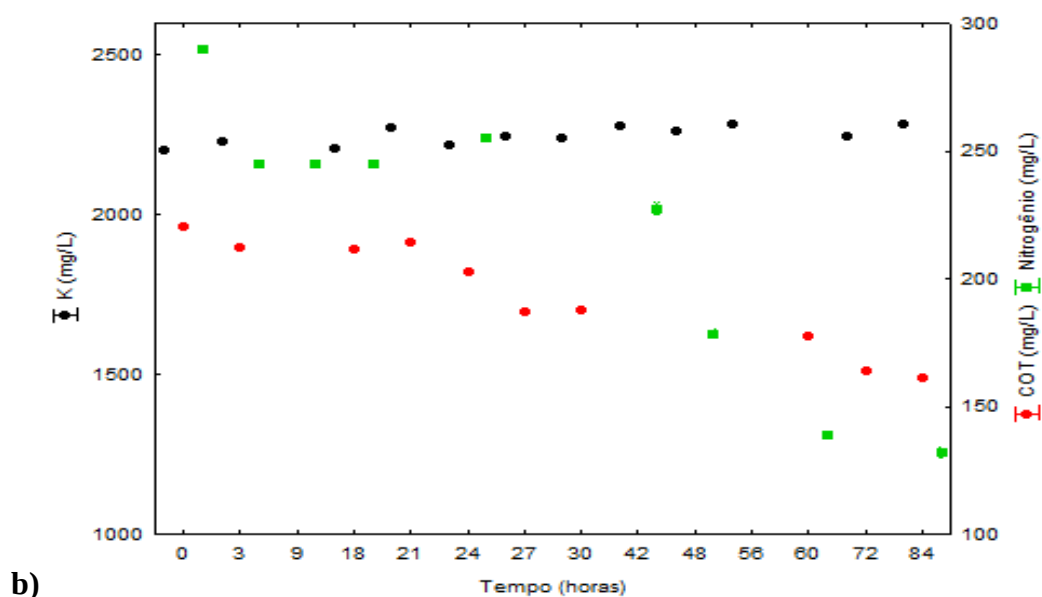
4.1.5.1. Estudo cinético PMGL

Para o estudo cinético da bioprodução (Figura 16), foram estabelecidas as condições maximizadas de meio complexo (42 g/L de pectina cítrica, 0,02 /L de sulfato de ferro e 40 g/L de extrato de levedura nas condições operacionais de 180 rpm, 30°C e pH_{inicial} 5,5), tendo por objetivo avaliar o comportamento da atividade PMGL (U/mL), biomassa (g/L), pH e consumo de substratos em função do tempo (h).

Figura 16: (a) Estudo cinético na bioprodução de PMGL (U/mL), produção de biomassa (g/L), evolução do pH e consumo de Mg, Fe e Mn (mg/L) em função do tempo (h); (b) Cinética do consumo dos substratos COT, N₂ e K (mg/L) em função do tempo (h), respectivamente.



a)



Ao analisar a Figura 16, verifica-se que a máxima atividade de PMGL foi de 23,68 U/mL no tempo de 60 h, estando associada à fase exponencial de crescimento do micro-organismo. Em relação ao pH, observa-se que, de forma geral, permaneceu estável durante a bioprodução.

Em relação ao consumo de microminerais (Figura 16a), tais como manganês e ferro, foi verificada redução de aproximadamente 42% ao de manganês e de 27% de ferro, ao final da bioprodução, respectivamente.

De acordo com a Figura 16 (b) verifica-se que o consumo de carbono orgânico total e nitrogênio apresenta comportamento semelhante com um consumo pronunciado após as 27 h de bioprodução, com um decréscimo de aproximadamente 14% para o COT e 52% para o nitrogênio durante as 84h de bioprodução. No que se refere ao consumo de magnésio (Figura 16a) e potássio (Figura 16b) observou-se uma queda não expressiva em relação aos demais minerais, sendo de 13 e 2% o consumo total, respectivamente.

4.1.5.2. Caracterização parcial do extrato bruto de PMGL

Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto de PMGL produzido em meio complexo nas condições maximizadas de 42 g/L de pectina cítrica, 0,02 g/L de sulfato de ferro, 40 g/L de extrato de levedura, 5×10^6 esporos/mL, 30°C, 84 h, pH_{Inicial} 5,5 e 180 rpm, foram definidos baseados em um planejamento de experimentos. A Tabela 22 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais), e os

resultados da atividade enzimática da pectina liase na qual observa-se que a maior atividade foi de 51,80 U/mL (Ensaio 1) em pH 3,0 e 37°C.

Tabela 22: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática de pectina liase.

<i>Ensaio</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>		<i>Respostas</i>
	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>PMGL (U/mL)</i>
1	-1 (3,4)	-1 (37)	51,80
2	1 (5,5)	-1 (37)	38,11
3	-1 (3,4)	1 (73)	52,24
4	1 (5,5)	1 (73)	40,22
5	-1,41 (3)	0 (55)	51,82
6	1,41 (6)	0 (55)	37,13
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	41,53
8	0 (4,5)	1,41 (80)	17,68
9	0 (4,5)	0 (55)	33,47
10	0 (4,5)	0 (55)	33,84
11	0 (4,5)	0 (55)	33,71

A Tabela 23 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectina liase a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que as variáveis estudadas influenciaram na atividade da PMGL, sendo que pH e temperatura isolados apresentaram efeito positivo, porém a interação pH e temperatura foi negativo. Os fatores que não foram significativos foram adicionados á falta de ajuste para análise de variância ANOVA (Tabela 24).

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

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	33,63	0,109	309,83	0,00001
(1)pH (L)*	-11,63	0,133	-87,40	0,00013
pH (Q)*	15,19	0,158	95,62	0,000109
(2)Temperatura(L)*	-7,79	0,133	-58,52	0,000292
Temperatura(Q)	0,235	0,159	1,48	0,277077
1L.2L*	0,832	0,188	4,42	0,047508

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

A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PMGL em função das variáveis analisadas (temperatura e pH), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 24), onde obteve-se

um coeficiente de correlação de 0,83 e o F calculado de 7,11 vezes maior que o valor tabelado, o qual permitiu, também, a construção da superfícies de resposta e/ou curva de contorno apresentadas na Figura 17.

Tabela 24: Análise de variância para a atividade de PMGL do planejamento fatorial completo 2² em função de temperatura e pH.

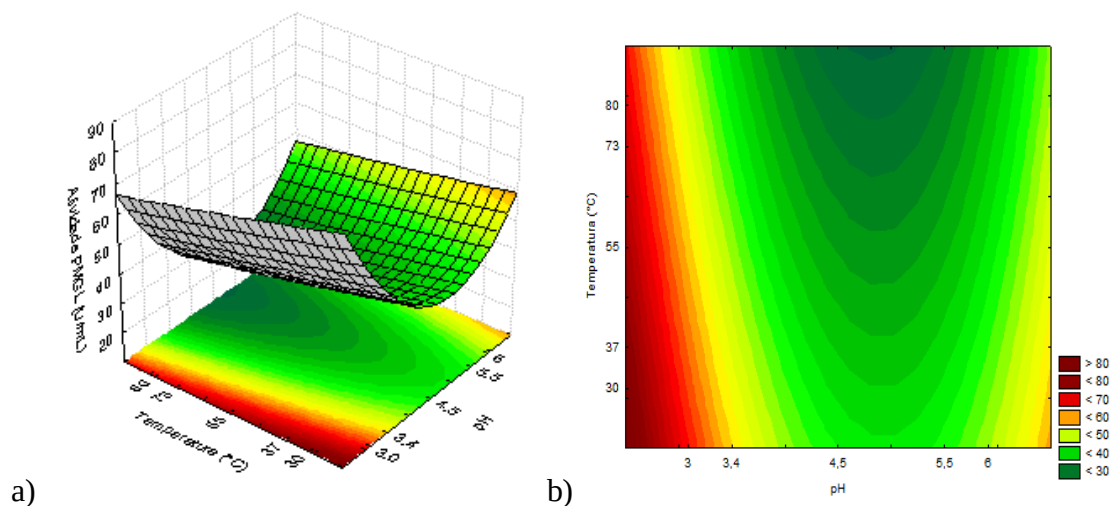
<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	742,01	4	185,50	3,55
Resíduo	312,94	6	52,16	
Falta de Ajuste	312,86	4		
Erro Puro	0,071	2		
Total	1054,94	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}} = 0,50$

$$\text{PMGL (U/mL)} = 33,63 - 11,63 \cdot \text{pH} + 15,19 \cdot (\text{pH})^2 - 7,79 \cdot T + 0,83 \cdot (\text{pH}) \cdot (T) \quad (4)$$

Onde: PMGL = Atividade de pectina liase (U/mL); T = Temperatura (°C).

Figura 17: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PMGL (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH.



De acordo com a Figura 17, verifica-se uma ampla faixa de temperatura (<73°C) e para o pH o ótimo da atividade de PMGL encontra-se em valores abaixo de 3,0.

Avaliação da estabilidade térmica

O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é mantida ao longo do armazenamento. Os

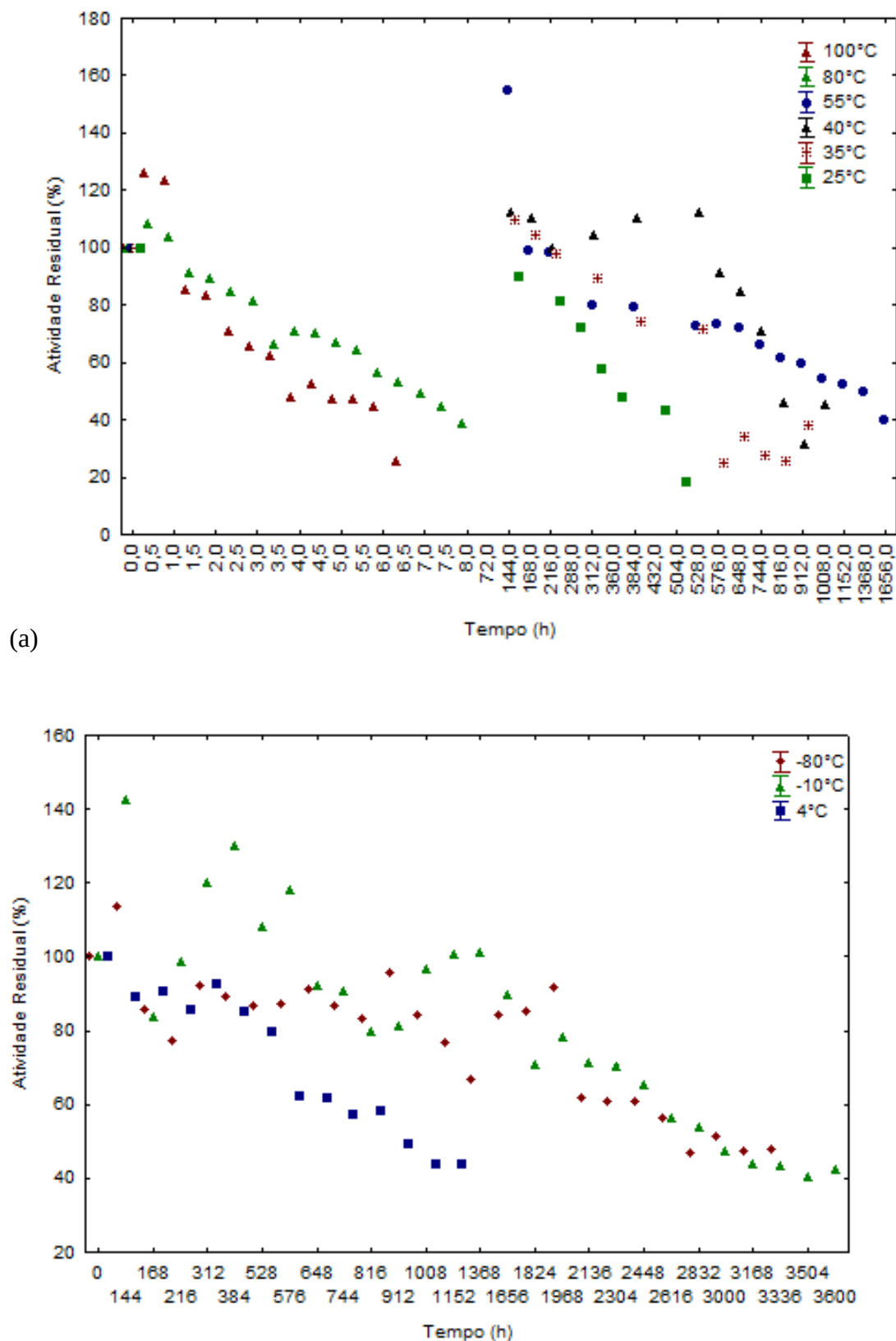
resultados da estabilidade a diferentes temperaturas do extrato enzimático bruto da PMGL estão apresentados na Figura 18 (a-b).

De acordo com a Figura 18 (a), verifica-se que houve um incremento da atividade inicial nas temperaturas 55, 80 e 100°C.. As maiores estabilidades foram encontradas nas temperaturas de 55, 40, 35 e 25°C, onde observa-se que a atividade residual de aproximadamente 50 % durante 1368, 1008, 528 e 360 h, respectivamente.

O extrato enzimático bruto obtido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi armazenado a 4, -10 e -80°C (Figura 18 b), mantendo-se a atividade residual de aproximadamente 50 % da atividade residual de PMGL por 912, 3000 e 3336 h, respectivamente.

Oliveira (2013) estudou a estabilidade térmica (20, 40, 60, 80 e 100°C) e estabilidade ao pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) da enzima produzida obtido após o processo fermentativo de poligalacturonase por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica* L.). Quanto ao estudo de estabilidade da poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto, esta mostrou boa estabilidade até em temperaturas altas. Com 74% da atividade relativa na temperatura de 80°C durante de 130 minutos Em temperaturas acima de 100°C ainda pode ser detectada.

Figura 18: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL submetido a (a) altas (100, 80, 55, 40, 35 e 25°C) e (b) baixas temperaturas (-80, -10 e 4°C), respectivamente.



De modo a avaliar a estabilidade térmica da pectina liase obtido por *A. niger* ATCC 9642, os dados obtidos experimentalmente foram plotados como $\ln (A/A_0)$ como uma

função do tempo. Seguindo este procedimento, a constante de desativação térmica (K_d) foi obtida para cada temperatura e apresentada na Tabela 25. Uma representação gráfica de $\ln(K_d)$ como uma função de $1/T$ (K) foi usada para calcular a energia de ativação (E_d) para a reação de desativação, obtido o valor de 3,13 kJ/mol para *A. niger* ATCC 9642. A temperatura mais estável foi de 55°C, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 5,71 h.

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

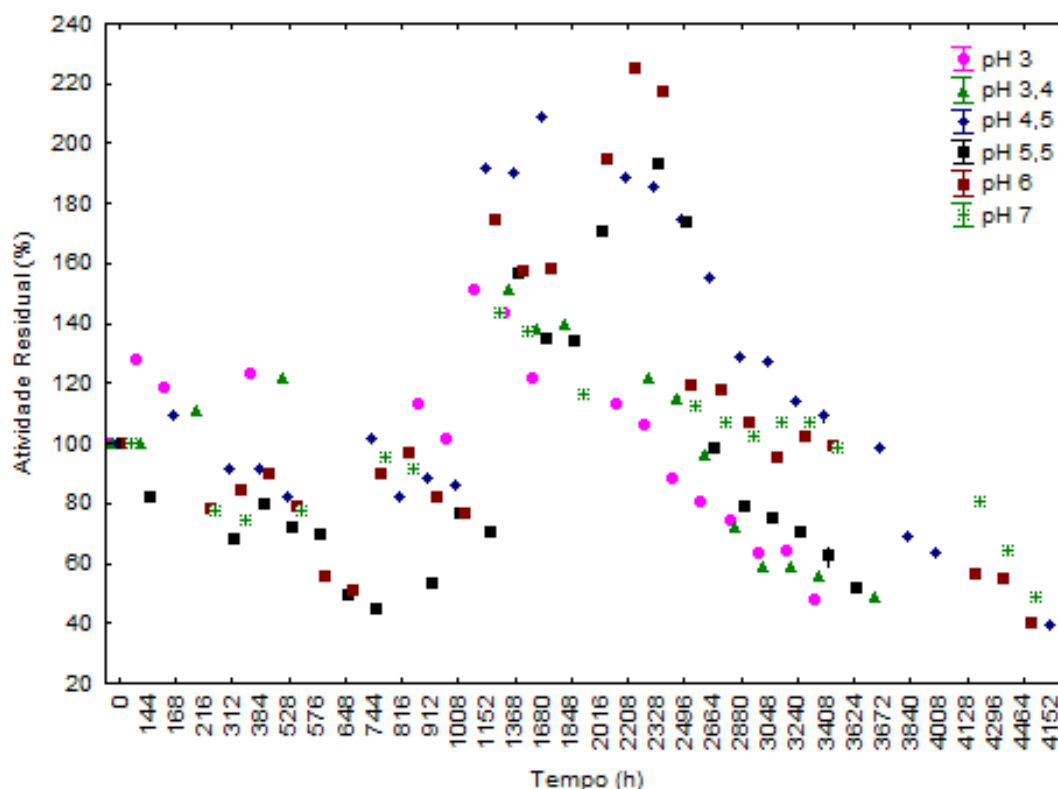
Tabela 25: Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da PMGL obtido pelo *A. niger* ATCC 9642.

Temperatura (°C)	K (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
25	0,207	1,82
35	0,307	1,23
40	0,152	2,48
55	0,066	5,71
80	0,88	0,43
100	1,436	0,26

Estabilidade a diferentes valores de pH

Para a análise da estabilidade do extrato bruto enzimático, foi realizado o ajuste do meio a diferentes pHs (3; 3,4; 4,5; 5,5; 6 e 7) e acondicionada a temperatura de 37°C. Através da Figura 19, observou-se que a partir de 1368 h, ocorreu um incremento da atividade para todos os valores de pHs avaliados, sendo que em pH 6 e em 2208 h a atividade residual foi de 25 % superior a atividade inicial. Para os valores de pH de 4,5, 6 e 7, o comportamento da atividade foi semelhante, mantendo-se a atividade residual de 80,7 % para o pH 7 e 56 % para o pH 6 no tempo de 4128 h e no pH 4,5 manteve 50 % da atividade residual em aproximadamente 4128 h.

Figura 19: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL submetido a diferentes pH 3; 3,4;4,5; 5,5; 6 e 7



Oliveira (2013) obteve no estudo de estabilidade em relação às variações de pH, que a enzima não apresentou boa estabilidade em relação aos tempos nos valores de pH entre 3 e 8. Mas apresentou 157% de atividade relativa em pH 3, apresentando atividade em todas as faixas estudadas.

4.2. Bioprodução de pectinases em meio a base de substratos agroindustriais

4.2.1. Caracterização dos substratos agroindustriais

Na Tabela 26 encontram-se os resultados para o teor de pectina (g/L), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio (mg/L) dos substratos agroindustriais (CL – Casca de laranja, AMM – Água de maceração de milho, APA – Água de parboilização de arroz).

Tabela 26: Teores de pectina, nitrogênio e carbono orgânico total (TOC) dos substratos agroindustriais.

Substratos Agroindustriais	Pectina (g/L)	Carbono (mg/L)	N₂ (mg/L)
CL	46 ±0,26	-	3200 ^a ±95,39
AMM	-	485,50 ^a ±22,08	900 ^c ±36,71
APA	-	7,88 ^b ±0,02	1200 ^b ±78,44

Média ± Desvio padrão seguidas de letras iguais/colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (Teste Tukey).

Colet (2012) ao caracterizar os resíduos agroindustriais para a bioprodução de carotenoides pelo micro-organismo *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 para produção em batelada alimentada observou que AMM e APA apresentaram 21648 e 743 mg/L de carbono orgânico total, e 4371 e 125 mg/L de nitrogênio total, respectivamente. Estes valores são superiores ao do estudo, porém são substratos de fontes diferentes, podendo estes serem mais concentrados que o utilizado no trabalho.

Os resultados dos minerais (micro e macronutrientes) dos substratos agroindustriais brutos encontram-se descritos na Tabela 27.

Tabela 27: Teores de minerais dos substratos agroindustriais.

Minerais	Subprodutos agroindustriais		
	Casca de Laranja	Água de maceração de milho	Água de parboilização de arroz
Ca (mg/L)	361,42 ^c ± 3,21	1017,62 ^a ± 25,02	937,52 ^b ± 19,39
Cu (mg/L)	19,03 ^a ± 0,15	5,12 ^b ± 0,09	3,74 ^c ± 0,06
Mg (mg/L)	397,62 ^a ± 3,97	171,41 ^b ± 1,37	114,70 ^c ± 1,22
Mn (mg/L)	31,78 ^a ± 0,51	0 ^c ± 0,00	3,26 ^b ± 0,06
Zn (mg/L)	49,40 ^a ± 0,62	3,33 ^b ± 0,07	2,37 ^c ± 0,02
Na (mg/L)	3457,23 ^a ± 77,76	95,48 ^c ± 1,72	182,63 ^b ± 1,46
Fe (mg/L)	60,20 ^a ± 1,02	8,84 ^b ± 3,82	4,38 ^c ± 0,07

Média ± Desvio padrão seguidas de letras iguais/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (Teste Tukey).

De acordo com a Tabela 27, observa-se que a água de parboilização de arroz e água de maceração de milho apresentaram concentrações consideráveis de cálcio, 1017,62 mg/L e 937,52 mg/L, respectivamente, já o cobre (19,03 mg/L), magnésio (397,62 mg/L), manganês (31,78 mg/L), zinco (49,4078 mg/L), sódio (372 mg/L) e o ferro (6078 mg/L), tiveram valores maiores na amostra de casca de laranja. Estes minerais podem desempenhar funções fundamentais para o processo de bioprodução e exercem funções importantes no metabolismo celular, sendo o magnésio, o cofator chave para diversas reações enzimáticas.

Valduga *et al.* (2007) estudaram o pré-tratamentos da água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), através do desenvolvimento de diferentes pré-tratamentos para o substrato industrial, da caracterização do substrato *in natura* e pré-tratado e otimização da bioprodução de carotenóides em meio industrial pré-tratado. Foi observado que a água de maceração de milho *in natura* foi rica em nitrogênio (3730 mg/L), potássio (1840 mg/L), magnésio (723 mg/L), manganês (55 mg/L) e zinco (11 mg/L), valores estes superiores ao do estudo, isto pode ser explicado pelo substrato ser de diferente procedência.

4.2.1.1. Produção de Exo- poligalcturonase (exo-PG)

A Tabela 28 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade enzimática de exo-PG e pH. A máxima atividade de exo-PG foi de 1,85 U/mL (Ensaio 5), com meio de cultivo composto por 80 g/L de casca de laranja, 60 g/L de água de maceração de milho e 450 g/L de água de parboilização de arroz e nas condições de 180 rpm, 30°C, 120 h. 5×10^6 esporos/mL e pH_{inicial} 5,5.

Tabela 28: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em produção da enzima exo-PG.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Resposta	
	X_1	X_2	X_3	PG (U/mL)	pH
1	-1 (80)	-1 (60)	-1 (150)	1,70	4,98
2	1 (160)	-1 (60)	-1 (150)	1,49	5,05
3	-1 (80)	1 (240)	-1 (150)	0,52	5,85
4	1 (160)	1 (240)	-1 (150)	0,46	5,94
5	-1 (80)	-1 (60)	1 (450)	1,85	5,42
6	1 (160)	-1 (60)	1 (450)	1,46	4,93
7	-1 (80)	1 (240)	1 (450)	0,78	5,95
8	1 (160)	1 (240)	1 (450)	0,81	6,06
9	0 (120)	0 (150)	0 (300)	1,45	5,17
10	0 (120)	0 (150)	0 (300)	1,48	5,64
11	0 (120)	0 (150)	0 (300)	1,43	5,6
12	-1,68 (52.8)	0 (150)	0 (300)	1,56	5,4
13	1,68 (187.2)	0 (150)	0 (300)	0,95	5,77
14	0 (120)	-1,68 (0)	0 (300)	0,71	2,46
15	0 (120)	1,68 (301.2)	0 (300)	0,54	6,17
16	0 (120)	0 (150)	-1,68 (48)	1,12	5,68
17	0 (120)	0 (150)	1,68 (552)	1,57	5,61

* X_1 = Casca de Laranja (g/L), X_2 = Água de maceração de milho (g/L), X_3 = Água de parboilização de arroz (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5, 5×10^6 esporos/mL, 120 horas.

A Tabela 29 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da exo-poligalacturonase a nível de confiança de 95%. As concentrações de casca de laranja, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz influenciaram significativamente ($p < 0,05$) sobre a atividade da exo-poligalacturonase. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 30).

Tabela 29: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de exo-poligalacturonase.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	1,45	0,016	92,09	0,0001
(1)Casca de Laranja (L)*	-0,244	0,015	-16,46	0,0036
Casca de Laranja (Q)*	-0,106	0,016	-6,49	0,0229
(2)AMM (L)*	-0,615	0,015	-41,57	0,0005
AMM (Q)*	-0,548	0,016	-33,63	0,0008
(3)APA (L)*	0,218	0,015	14,71	0,0045
1L.2L*	0,142	0,019	7,36	0,0179
2L.3L*	0,121	0,019	6,27	0,0244

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

Tabela 30: Análise de variância para a bioprodução de Exo-PG do planejamento fatorial completo 2^3 .

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	2,61	7	0,37	4,69
Resíduo	0,72	9	0,08	
Falta de Ajuste	0,71	7		
Erro Puro	0,0014	2		
Total	3,32	16		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 3,29$.

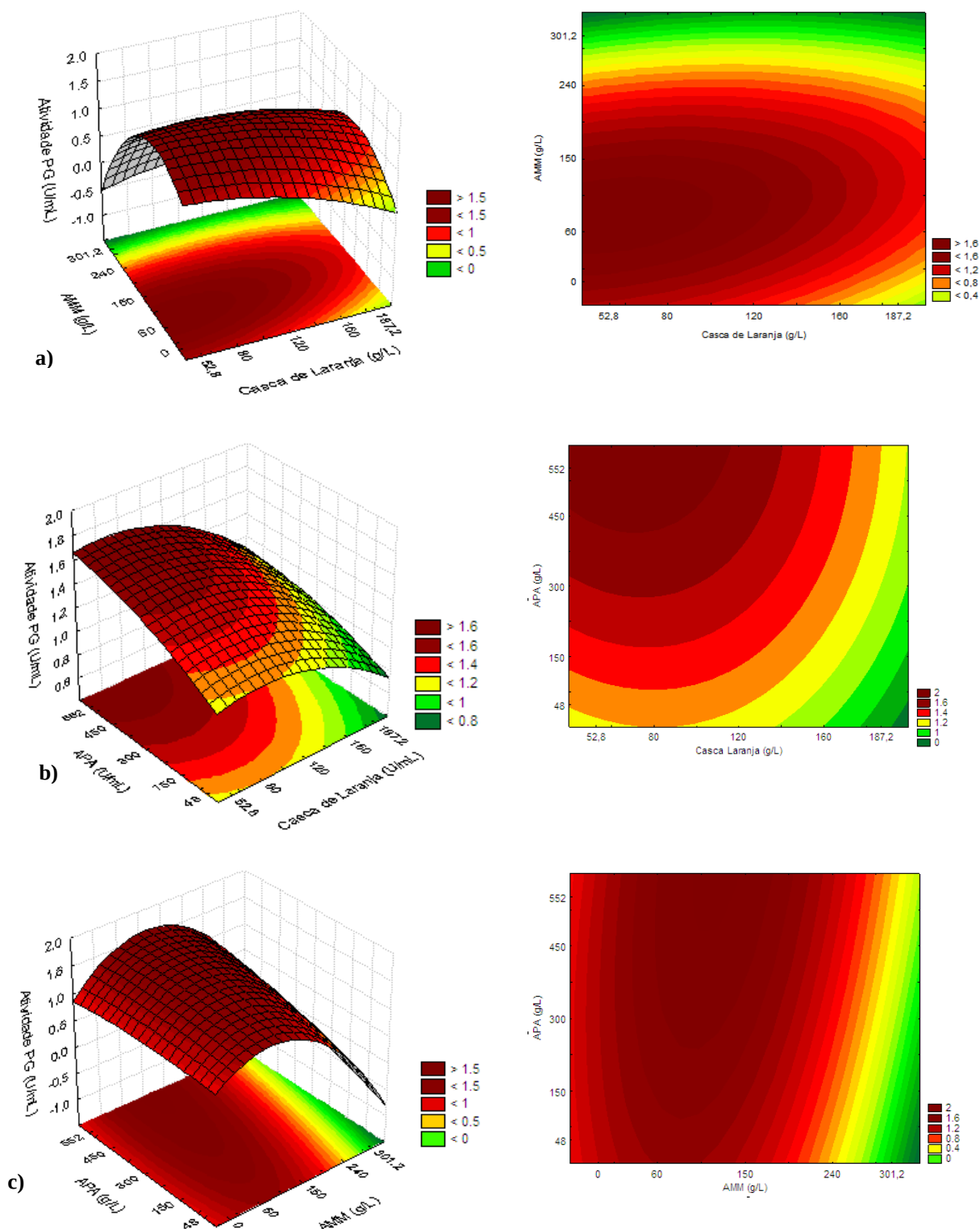
A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da exo-poligalacturonase em função da variáveis independentes (casca de laranja, água de maceração de milho e água parboilizada de arroz) dentro das faixas estudadas.

O modelo foi validado pela análise de variância, onde um coeficiente de correlação de 0,88 e F calculado de 1,42 vezes maior que o F tabelado, permitindo a construção da curva de contorno (Figura 20).

$$PG = 1,45 - 0,24X_1 - 0,10X_1^2 - 0,61X_2 - 0,54X_2^2 + 0,21X_3 + 0,14X_1X_2 + 0,1X_2.X_3 \quad (5)$$

Onde : PG= exo-poligalacturonase; X_1 = Casca de Laranja ; X_2 = Água de maceração de milho;
 X_3 = Água de parboilização de arroz

Figura 20: Curva de contorno em função da concentração (a) água de maceração de milho e casca de laranja, (b) água parboilizada de arroz e casca de laranja e (c) água parboilizada de arroz e água de maceração de milho.



4.2.1.2. Estudo cinético *exo-PG*

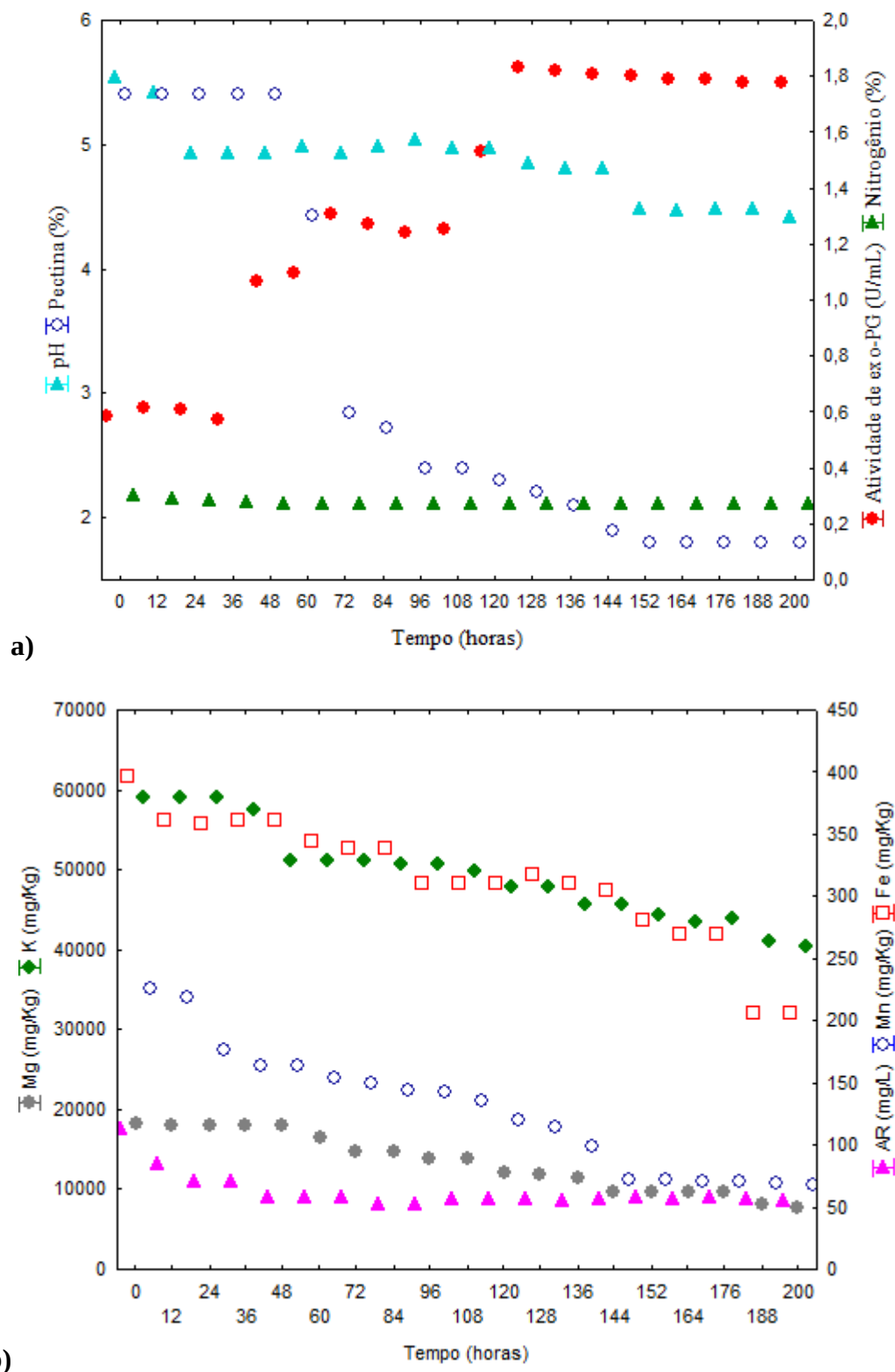
O estudo cinético na bioprodução de *exo-PG* foi realizado a partir das condições experimentais maximizadas (80 g/L de casca de laranja, 100 g/L de água de maceração de milho, 552 g/L de água de parboilização de arroz), em frascos agitados e nas condições de 30°C, 180 rpm e pH inicial de 5,5 e 5×10^6 esporos/mL, tendo por objetivo avaliar a atividade de *exo-PG* (U/mL) em função do tempo de bioprodução (h), o consumo de substrato (pectina, açúcar redutor, N₂, K, Mg, Mn, Fe) e pH, conforme demonstrado na Figura 21.

A Figura 21 (a-b), apresenta a avaliação cinética em termos de consumo de substrato (pectina, açúcares redutores, N₂, K, Mg, Mn e Fe) e a evolução do pH e produção de *exo-PG*. Observar-se que a atividade máxima de *exo-PG* foi de 1,83 U/mL em 128 h de bioprodução.

O pH (Figura 21a) diminuiu nas primeiras 24 h (5,5 a 5,0) e manteve-se cerca de 5,0 até 144 h e mantendo-se em cerca de 4,5 até ao final da bioprodução. De acordo com Cordeiro e Martins (2009), esta redução do pH pode ser explicado pela libertação de ácido galcturônico nos meios devido à ação de enzimas pectinolíticas. Estas enzimas são produzidas por micro-organismos, durante as primeiras horas de fermentação. Segundo Ming-Chu *et al.* 1992, as mudanças de pH no meio de cultura é resultado do consumo de substrato. Quando os íons de amônio são utilizados pelos micro-organismos, o meio é acidificado e quando o nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) é assimilado, o meio é alcalinizado.

Em relação a pectina (Figura 21a), há um consumo de 51 % entre 48 e 72 h e, após este período, uma redução progressiva com um consumo total de 67 %. Demonstrando que há uma correlação entre o consumo de pectina com um aumento da atividade enzimática. O consumo de açúcares redutores foi de 50 % nas primeiras 24 h após permanecer praticamente constante. Durante o período inicial, o fungo consome açúcares prontamente disponíveis, no entanto, a produção de enzimas ocorre em resposta a depleção de nutrientes quando o micro-organismo começa a utilizar os substratos complexos (Figuras 21a e 21b), o mesmo comportamento foi verificado por Kaur *et al.* (2012).

Figura 21: (a) Estudo cinético na bioprodução de exo-PG (U/mL), evolução do pH e consumo pectina (%) e N_2 (%) em função do tempo (h); (b) Cinética do consumo Mg, K, Mn Fe e açúcares redutores (mg/L) em função do tempo (h), respectivamente.



A análise do consumo dos substratos permite observar um comportamento semelhante entre o potássio, magnésio e ferro (Figura 21b), indicando uma diminuição lenta e progressiva

durante a bioprodução, com um consumo total de 33, 46 e 50 %, respectivamente. A partir das fontes de minerais, a assimilação mais expressivo foi observado para o manganês, o que corresponde a 73 %.

Segundo Malvessi & Silveira (2004) e Martínez-Trujillo *et al.* (2009), dentre os fatores que afetam o crescimento microbiano e a biossíntese da enzima pode-se destacar a composição do meio de cultura, em particular a fonte de carbono, a presença de indutores (pectina e derivados), e outras condições de cultura, tais como o pH do meio de cultivo, a temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação.

4.2.1.3. Caracterização parcial da *exo-poligalacturonase (exo-PG)*

pH e Temperatura ótimos

A determinação dos valores ótimos de temperatura e pH do extrato bruto de *exo-PG* maximizados em meio a base de substratos agroindustriais (80 g/L de casca de laranja, 100 g/L de água de maceração de milho e 552 g/L de água de arroz parcialmente cozido, pH 5,5; 180 rpm, 30°C, 128 h e 5×10^6 esporos/mL), encontram-se descritos na Tabela 31, a qual mostra a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais), bem como os resultados da atividade de PG. Observa-se que a atividade máxima foi de 1,72 U/mL (Ensaio 2) a pH 5,5 e temperatura de 37°C.

A Equação 6 mostra o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade de *exo-PG* em função das variáveis analisadas (temperatura e pH) dentro faixa estudada. O modelo foi validado (Tabela 32). pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,98 e um valor de F calculado foi de 6,17 vezes maior que o F tabelado, o qual permitiu a construção de superfície de resposta e curva de contorno (Figura 22). Os fatores que não foram significativo foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância ANOVA (Tabela 33).

$$\text{Exo-PG (U/mL)} = 1,65 + 0,42.X_4 - 0,32.X_4^2 - 0,28X_5 - 0,49X_5^2 - 0,05 X_4.X_5 \quad (6)$$

Onde: Exo-PG = Atividade de *exo-PG* (U/mL); X_4 = pH; X_5 = Temperatura

Tabela 31: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (com 3 pontos centrais) e resposta das variáveis Temperatura e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG
	pH	Temperatura	U/mL
1	-1(3,4)	-1(37)	0,78
2	1(5,5)	-1(37)	1,72
3	-1(3,4)	1(73)	0,28
4	1(5,5)	1(73)	1,01
5	-1,41(3)	0(55)	0,27
6	1,41(6)	0(55)	1,50
7	0 (4,5)	-1,41(30)	0,92
8	0 (4,5)	1,41(80)	0,17
9	0 (4,5)	0(55)	1,68
10	0 (4,5)	0(55)	1,63
11	0 (4,5)	0(55)	1,64

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

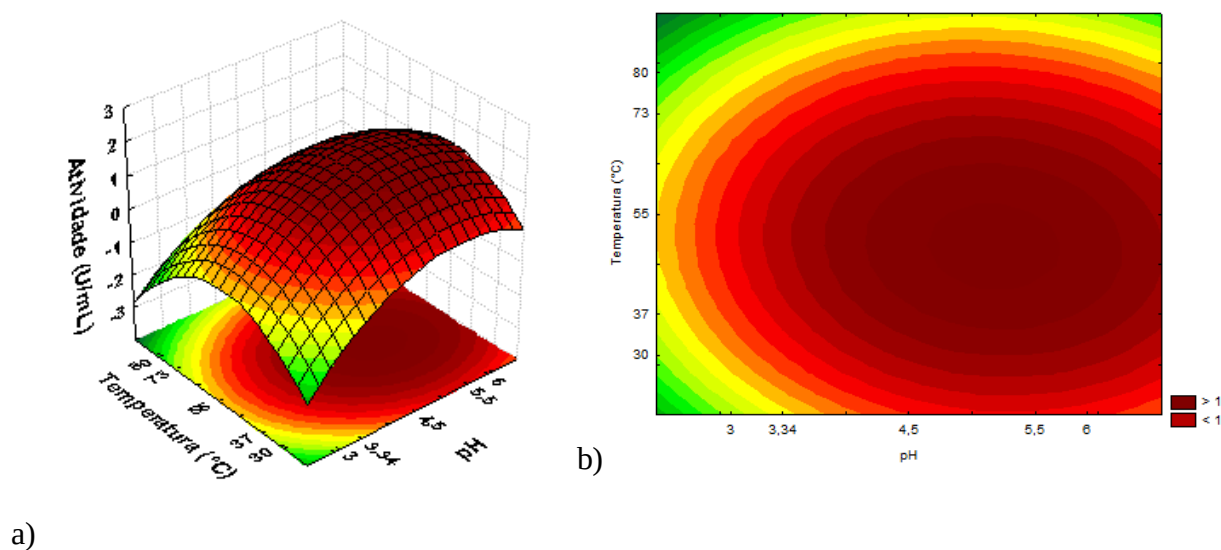
	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	1,65	0,013	123,16	0,00006
(1)pH (L)*	0,42	0,008	51,59	0,00037
pH (Q)*	-0,32	0,009	-33,41	0,00089
(2)Temperatura(L)*	-0,28	0,008	-34,33	0,00084
Temperatura(Q)*	-0,49	0,009	-50,38	0,00039
1L by 2L*	-0,05	0,01	-4,72	0,04192

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)**Tabela 33:** Análise de variância para a bioprodução de exo-PG do planejamento fatorial completo 2^2 .

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado
Regressão	5	3,67	0,73	31,18
Resíduo	5	0,12	0,02	
Falta de Ajuste	3	0,11		
Erro Puro	2	0,001		
Total	10	3,79		

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

Figura 22: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PG (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH, respectivamente.



A partir da Figura 22, é possível verificar as atividades mais elevadas de PG em temperatura próxima a 55°C e em pH na faixa de 5,0. Na literatura, alguns estudos realizaram a caracterização da exo-PG. Kashyap *et al.* (2000) corroboram com este estudo, no qual a poligalacturonase de *Aspergillus niger*, onde a máxima atividade foi obtida a 50°C, assim como Moyo *et al.* (2003) que descreve o comportamento da PG produzida por *Kluyveromyces wickerhamii* apresentando como ótima a mesma faixa de temperatura. Quiroga *et al.* (2009) relata resultado da PG produzida por *Pycnoporus sanguineus* onde apresenta a atividade máxima entre 50 - 60°C e um pH ótimo de 4,8. Por outro lado, Mohamed *et al.* (2006) avaliaram a poligalacturonase de *Trichoderma harzianum* e atividade ótima foi a 40°C. Outros autores verificaram o ótimo na mesma faixa de temperatura ótima (40 a 50°C) para a PG, de *Bacillus* sp. (Kobayashi *et al.*, 2001), *flaves Mucor* (Gadre *et al.*, 2003) e de *T. reesei* (Mohamed *et al.*, 2003).

Estabilidade térmica

Os resultados obtidos na avaliação de estabilidade a baixas temperaturas de -80, -10, 4°C são apresentados na Figura 23 (a), onde se observa que quando o extrato bruto foi armazenado a -80, -10 e 4°C mostraram uma atividade residual de PG de cerca de 50 % no período de 808, 756 e 304 h, respectivamente. No entanto, os resultados obtidos na avaliação de estabilidade a altas temperaturas de 25, 35, 40, 55, 80 e 100°C (Figura 23b), o extrato enzimático bruto apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 40 e 55°C, com uma

atividade residual de 50 % em 240 e 276 h, seguido das temperaturas de 35 e 25°C por um período de 84 e 48 h, respectivamente.

A enzima PG de *Aspergillus giganteus* manteve 80% de sua atividade original após 50 min de incubação a 55°C. O aquecimento desta enzima a 55°C por 10 min resultou em desnaturação rápida e apenas cerca de 9,5% da sua atividade foi retida (PERDOLLI *et al.*, 2008).

Silva *et al.* (2002) relataram que a PG de *Penicillium viridicatum* RFC3 perdeu 90% da sua atividade original após 1h de incubação a 55°C. Por outro lado, Martins *et al* (2002) mostraram que a PG de *Thermoascus aurantiacus* 179-5 manteve 100% da atividade original durante 2h a 60°C. Enquanto que a PG de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 foi 100% estável a 50°C por 1h (MARTINS *et al.*, 2007).

De modo a comparar a estabilidade térmica da poligalacturonase obtido por *A. niger* ATCC 9642, os dados obtidos experimentalmente foram representados como $\ln(A/A_0)$ como uma função do tempo. Seguindo este procedimento, a constante de desativação térmica (K_d) foi obtida em cada temperatura. Uma representação gráfica de $\ln(K_d)$ como uma função de $1/T$ (K) foi usada para calcular a energia de ativação (E_d) para a desativação da reação e foi de 5,01 kJ mol. A poligalacturonase foi mais estável a 40 e 55°C (Tabela 34), apresentando um tempo de meia-vida de 63 h para ambas as temperaturas.

Tabela 34: Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da exo-PG obtido pelo *A. niger* ATCC 9642.

Temperature (°C)	K (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
25	0,005	25,20
35	0,015	8,40
40	0,002	63
55	0,002	63
80	0,009	14
100	0,009	14

Tari *et al.* (2008) observaram que a meia-vida de poligalacturonase de *Aspergillus sojae* a 75°C foi de 2,25, 4,97 e 3,53 vezes maior do que os valores de meia-vida a temperaturas de 80, 82,5 e 85°C, respectivamente, sendo que a energia de desativação da poligalacturonase foi de 152 kJ mol⁻¹. Shuler e Kargi (2002) observaram valores estimados na faixa de 167 a 293 kJ mol⁻¹ para muitas enzimas microbianas. A energia de desativação estimada para esta enzima foi de 1,05, 0,92 e 0,96 vezes maior do que as poligalacturonases comercial Rapidase C80, Pectinase CCM e Pectinex 3XL, respectivamente (ORTEGA *et al.*, 2004). Estes resultados indicaram que o extrato enzimático bruto pode ser considerado como um potencial para várias aplicações industriais.

Estabilidade em diferentes pH

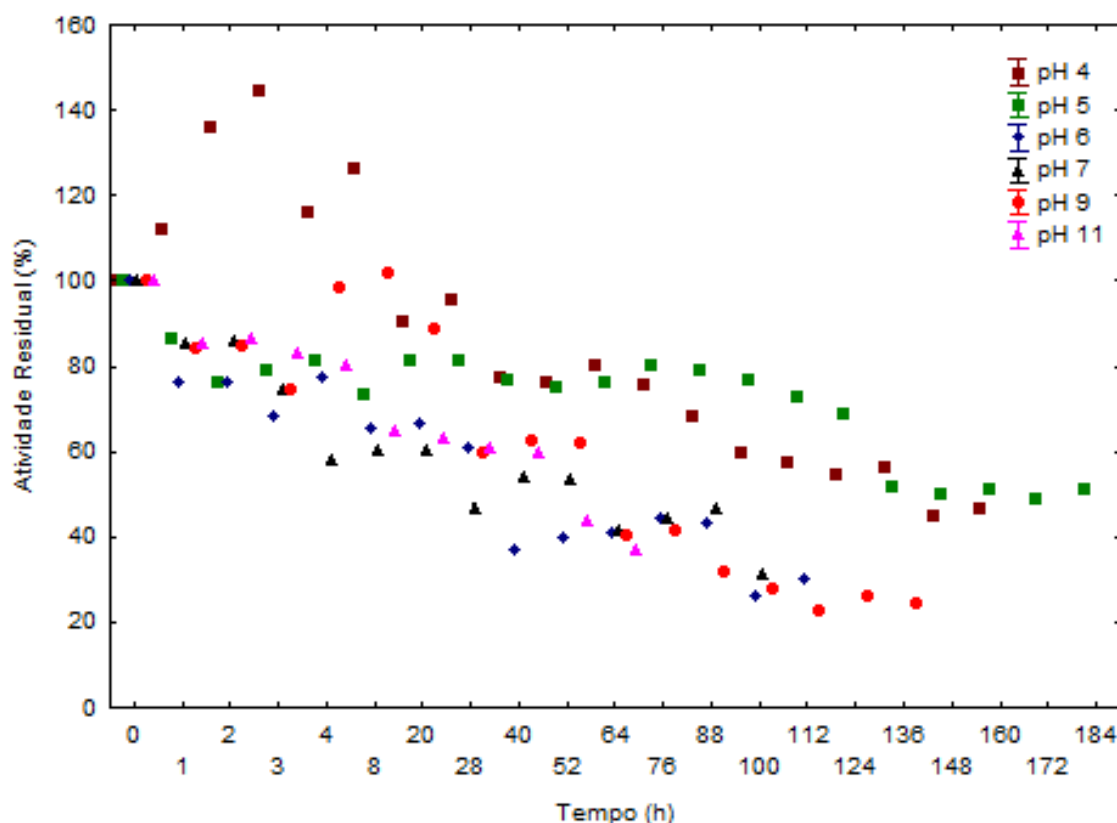
A estabilidade do extrato enzimático bruto de exo-PG bioproduzida a base substratos agroindustriais foi avaliada a diferentes valores de pH em função do tempo, incubado a 55°C e em pHs de 4,0 a 11,0, conforme apresentado na Figura 24. O extrato enzimático bruto apresentou a maior estabilidade em pH 5,0 e 4,0, retendo 50 % da sua atividade inicial até aproximadamente 160 h de armazenamento em ambos valores de pHs. Com essa faixa de pH (4,0 a 5,0), esta enzima tem uma promissora aplicação em processos industriais em pHs ácidos, como na indústria de bebidas (sucos, vinhos e outros).

Gomes *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade de PG produzido por *A. niger* usando meio complexo (concentração de pectina de 32 g/L, a concentração de L-asparagina de 2 g/L, a concentração de fosfato de potássio 0,06 g/L, a concentração de sulfato de ferro de 1,0 g/L) observaram que a 55°C e pH de 5,0, manteve 60 % de sua atividade inicial PG durante 350 dias e 150 h de armazenamento, respectivamente. Kant *et al.* (2013) estudou a estabilidade de poligalacturonase purificada a partir de *Aspergillus niger* (MTCC 3323), descobriram que a enzima era estável na faixa de pH 4,0 a 5,5 durante 1 h. A 4°C reteve 50 % da atividade após

108 h e à temperatura ambiente até 3 h. Hoondal (2002) avaliaram PG de *Aspergillus fumigatus*, que manteve a sua atividade em um intervalo de pH de 3,0-9,0.

O pH é considerado um parâmetro importante envolvida na produção e manutenção de pectinases, porque as alterações no pH pode influenciar a atividade enzimática através de alterações conformacionais na molécula, proporcionando assim alterações no sítio ativo, resultando na redução ou aumento da sua afinidade para o substrato (GARZÓN & HORAS, 1992).

Figura 24 – Estabilidade do extrato enzimático bruto da exo-PG submetido aos pH de 4, 5, 6, 7, 9 e 11.



Perdolli *et al.* (2008) relatam que a PG de *Aspergillus giganteus*, reteve mais de 90% de sua atividade, após 24 h de incubação em valores de pH entre 4,5 e 8,0. Um resultado similar foi obtido com a PG de *Penicillium viridicatum*, que manteve 90% da sua atividade, após incubação em pHs 5,0-8,5 (SILVA *et al.*, 2002). Martins *et al.* (2007) relataram que a PG de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 foi estável a pH 5,0-5,5 e manteve 33% da atividade inicial em pH 9,0 após 24 horas de incubação.

4.2.2. Pectinametilesterase (PME)

A Tabela 35 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade enzimática de PME e pH. A máxima atividade de PME foi de 39,05 U/mL (Ensaio 15), com meio de cultivo composto por 120 g/L de casca de laranja, 301,2 g/L de água de maceração de milho e 300 g/L de água de parboilização de arroz e nas condições de 180 rpm, 30°C, 120 h. 5×10^6 esporos/mL e pH_{inicial} 5,5, sendo justificado este valor pela menor quantidade de pectina presente na casca de laranja, onde quando utilizada com pectina P.A. em concentração de 42g/L a atividade foi de 9 U/mL.

Tabela 35: Matriz do planejamento fatorial 2^3 valores codificados (reais) e respostas em produção da enzima pectinametilesterase.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Resposta	
	X_1	X_2	X_3	PME (U/mL)	pH
1	-1 (80)	-1 (60)	-1 (150)	16,40	4,98
2	1 (160)	-1 (60)	-1 (150)	9,80	5,05
3	-1 (80)	1 (240)	-1 (150)	37,10	5,85
4	1 (160)	1 (240)	-1 (150)	32,15	5,94
5	-1 (80)	-1 (60)	1 (450)	16,10	5,42
6	1 (160)	-1 (60)	1 (450)	13,05	4,93
7	-1 (80)	1 (240)	1 (450)	28,40	5,95
8	1 (160)	1 (240)	1 (450)	34,95	6,06
9	0 (120)	0 (150)	0 (300)	28,35	5,17
10	0 (120)	0 (150)	0 (300)	29,95	5,64
11	0 (120)	0 (150)	0 (300)	27,35	5,60
12	-1,68 (52,8)	0 (150)	0 (300)	24,00	5,40
13	1,68 (187,2)	0 (150)	0 (300)	28,35	5,77
14	0 (120)	-1,68 (0)	0 (300)	12,50	2,46
15	0 (120)	1,68 (301,2)	0 (300)	39,05	6,17
16	0 (120)	0 (150)	-1,68 (48)	24,40	5,68
17	0 (120)	0 (150)	1,68 (552)	20,00	5,61

* X_1 = Casca de Laranja (g/L), X_2 = Água de maceração de milho (g/L), X_3 = Água parboilizada de arroz (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, 120 h e pH_{inicial}= 5,5.

A Tabela 36 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectinametilesterase a nível de confiança de 95 %. A concentração de água de maceração de milho teve efeito significativo positivo e a água de parboilização de arroz teve uma influência significativa negativa respectivamente ($p < 0,05$) sobre a atividade

da pectinametilesterase. Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 37).

Tabela 36: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2³ para atividade de pectinametilesterase.

	<i>Coefficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	28,61	0,7555	37,87	0,0007
(1) Casca de Laranja(L)	-0,05	0,3550	-0,15	0,8923
Casca de Laranja (Q)	-1,06	0,3911	-2,71	0,1133
(2)AMM (L)*	8,93	0,3550	25,15	0,0015
AMM (Q)	-1,20	0,3911	-3,07	0,0915
(3)APA (L)	-0,75	0,3550	-2,13	0,1663
APA (Q)*	-2,46	0,3911	-6,31	0,0241
1L.2L	1,40	0,4636	3,03	0,0936
1L.3L	1,88	0,4636	4,05	0,0557
2L.3L	-1,10	0,4636	-2,38	0,1397

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 37: Análise de variância para a bioprodução de PME do planejamento fatorial 2³.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	121,98	9	135,78	21,10
Resíduo	45,04	7	6,43	
Falta de Ajuste	41,60	5		
Erro Puro	3,44	2		
Total	1267,02	16		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; F_{tab,95%} = 19,29.

A Equação 7 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da pectinametilesterase em função das variáveis independentes (casca de laranja, água de maceração de milho e água parboilizada de arroz) dentro das faixas estudadas.

$$\text{PME} = 28,6 + 8,93.X_2 - 2,46.X_3^2 \quad (7)$$

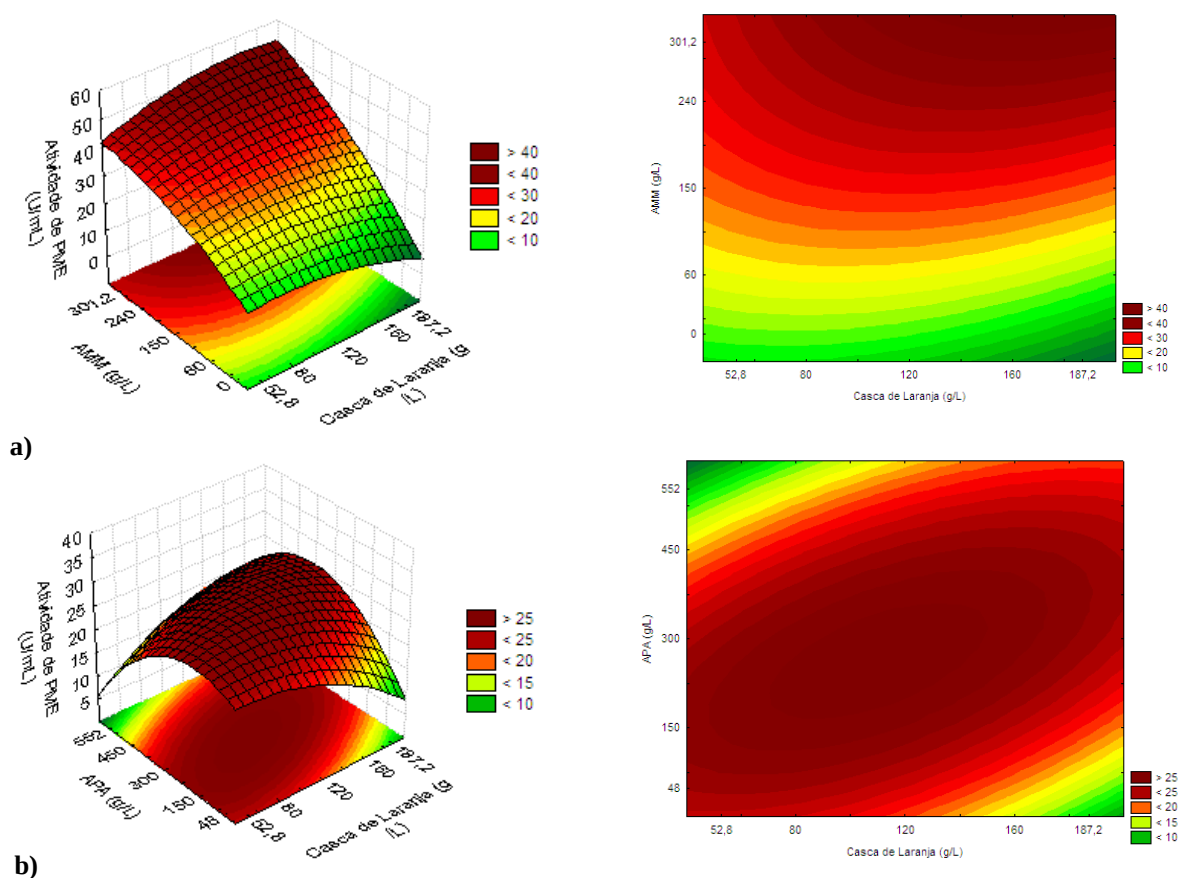
PME = Pectinametilesterase X₂ = Água de maceração de milho X₃ = Água de parboilização de arroz.

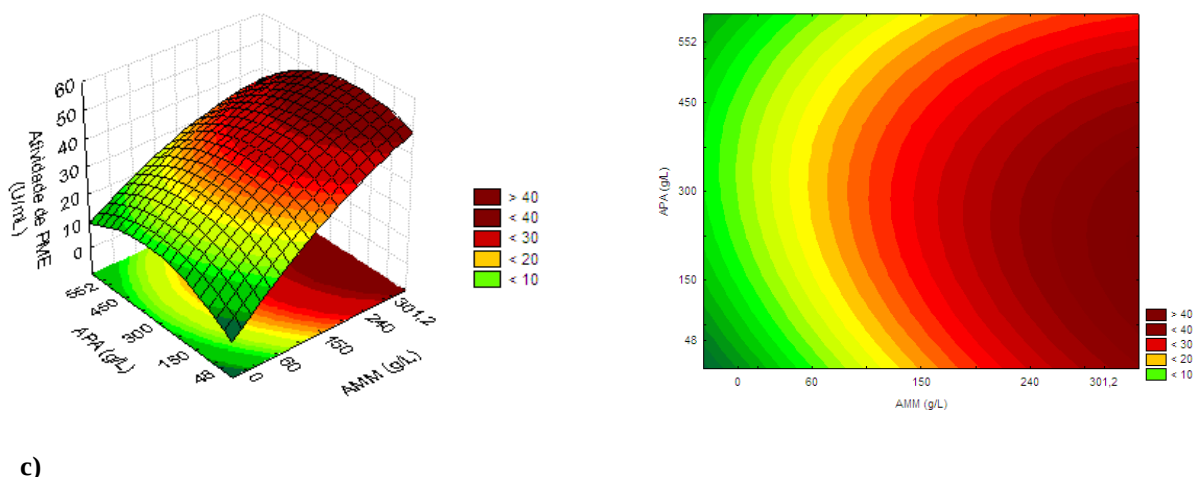
O modelo foi validado pela análise de variância, onde um coeficiente de correlação de 0,98 e F calculado 1,09 vezes maior que o F tabelado, permitiram a construção de

superfície de resposta e curva de contorno (Figura 26). O coeficiente de correlação quantifica a qualidade do ajuste, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, variando de 0 a 100 % (RODRIGUES & IEMMA, 2005). O valor de F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado, ou seja, sempre que esta relação for maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4 (BARROS, 1996).

A Figura 25 mostra a máxima produção de PME (39,05 U/mL), encontra-se na região próxima a concentração de 120 g/L de casca de laranja, 301,2 g/L de água de maceração de milho e 300 g/L de água parboilizada de arroz caracterizando a maximização da bioprodução.

Figura 25: Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração (a) água de maceração de milho e casca de laranja, (b) água parboilizada de arroz e casca de laranja e (c) água parboilizada de arroz e água de maceração de milho, respectivamente.





c)

Após realização do planejamento fatorial completo 2^3 , e analisado seus resultados, foram fixados as concentrações de casca de laranja (120 g/L), água parboilizada de arroz (300 g/L) e realizou-se teste variando as concentrações de água de maceração de milho (301,2, 340, 380, 500 e 600 g/L) a fim de confirmar a tendência da maior produção de PME como mostrado na Figura 25. Os resultados, apresentados na Tabela 38, confirmam a tendência de observada no planejamento 2^3 , de que quanto maior a concentração de água de maceração de milho, maior será a atividade de PME, observando a máxima atividade de 114 U/mL ao empregar 600 g/L de AMM, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade de PME entre as concentrações de AMM avaliadas.

Tabela 38: Atividade PME (U/mL) em função de diferentes concentrações de AMM.

AMM (g/L)	*Atividade de PME (U/mL)
301,2	42,26±0,45 ^c
340	56,03±0,35 ^d
380	66,86±0,40 ^c
500	82,86±0,40 ^b
600	114,44±0,45 ^a

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

4.2.2.1. Estudo cinético de PME

O estudo cinético de bioprodução de PME, consumo de substratos e pH (Figuras 26a e 26b) foram realizados a partir das condições experimentais maximizadas de 120 g/L de casca de laranja, 301,2 g/L de água de maceração de milho e 600 g/L de água parboilizada de arroz, 5×10^6 esporos/mL, 30°C, 180 rpm e pH_{inicial} 5,5). De acordo com a Figura 27(a), observa-se que a atividade máxima foi de 130 U/mL obtida em 124 horas de

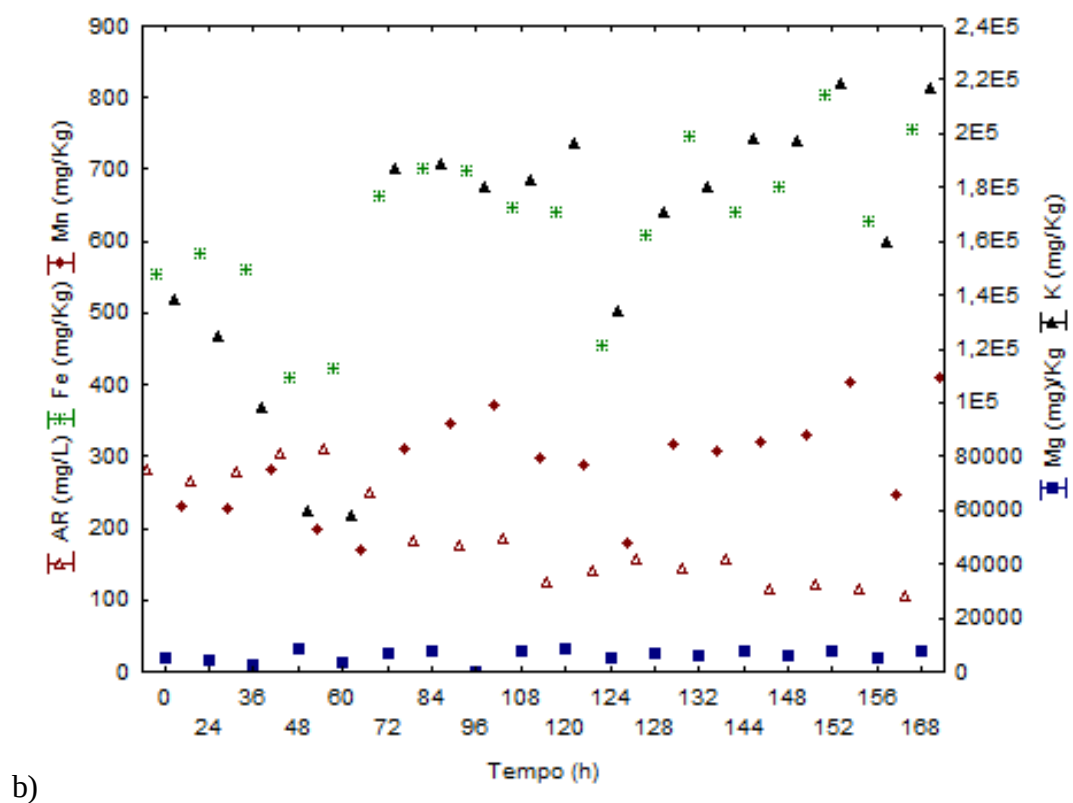
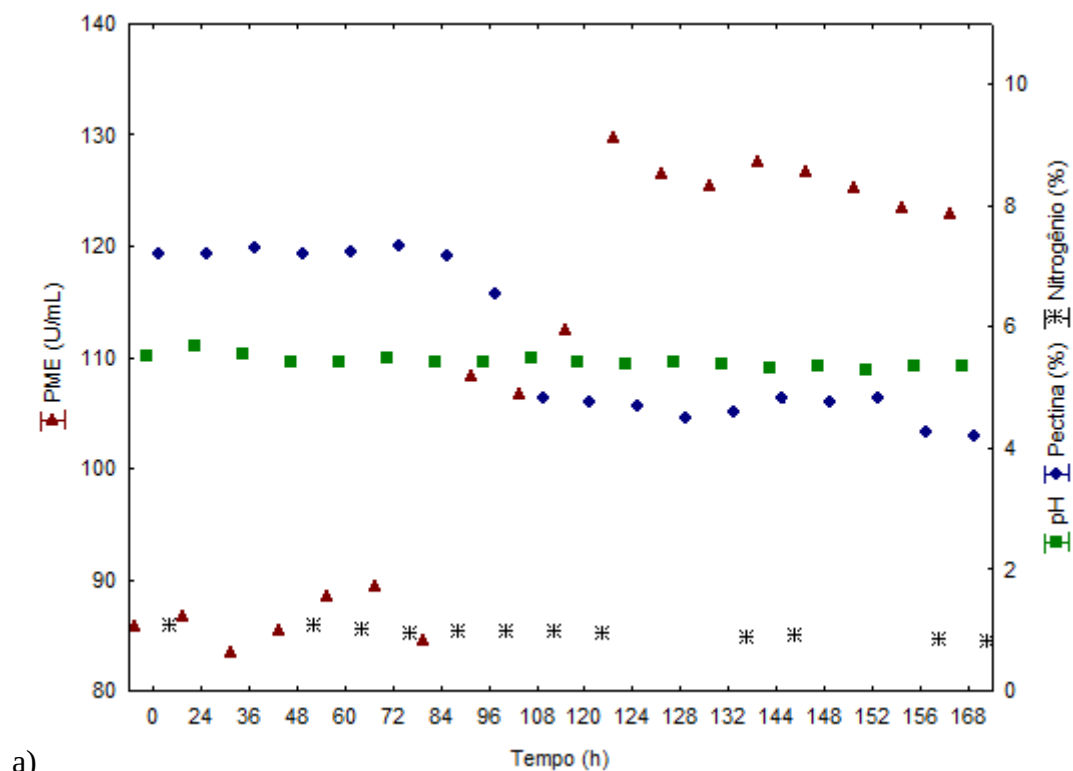
bioprodução. O pH permaneceu praticamente estável, oscilando entre 5,5 a 5,73 durante as 168 horas.

Ao analisar a assimilação dos substratos, observa-se o comportamento da pectina apresentando maior consumo no período onde ocorrem as maiores produções de PME (Figura 26a). O consumo de nitrogênio (Figura 26b), teve uma diminuição lenta e gradativa ao longo do processo de bioprodução, com consumo total de 23 %. Das fontes de minerais, as maiores assimilações foram para o manganês e potássio, correspondendo 34 e 57 % de consumo total, respectivamente. Em relação ao açúcar redutor, obteve-se uma grande redução de aproximadamente 63 % em relação ao valor inicial (282,44 mg/L).

Ressalta-se que a atividade enzimática da PME de 130 U/mL obtida pelo fungo filamentosso *A.niger* ATCC 9642, no presente estudo, é superior ao relatado por Aquino (2008) em preparado enzimático comercial (Pectinex AR), que apresentou atividade de 3,58 U/mL, sendo que para outros preparados comerciais como a Pectinex Ultra SP-L, Pectinex AR, Ultrazym AFP-L, Biopectinase CCM e Viscozyme L, a atividade da PME foi de 18,90; 29,98; 18,25 e 61,26 U/mL, respectivamente.

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

Figura 26: Estudo cinético da bioprodução de PME em função da atividade (U/mL), produção de biomassa (g/L), nitrogênio e pH pelo tempo (horas) (a) e em função do consumo de carbono e minerais pelo tempo (horas) (b), respectivamente.



Caracterização parcial da pectinametilesterase (PME)*Temperatura e pH ótimos*

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto produzido por *A. niger* ATCC 9642 em frascos agitados, nas condições otimizadas de bioprodução (casca de laranja -120 g/L, água de parboilização de arroz -300 g/L, água de maceração de milho - 600 g/L, pH - 5,5, 180 rpm, 30°C, 120 horas e 5×10^6 esporos/mL), foram definidos baseados em um planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais) conforme descrito na Tabela 39.

Tabela 39: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade pectinametilesterase em função de temperatura e pH ótimos.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Pectinametilesterase (U/mL)
	pH	Temperatura (°C)	
1	-1 (5,54)	-1 (37)	15,95
2	1 (9,8)	-1 (37)	70,95
3	-1 (5,54)	1 (73)	25,60
4	1 (9,8)	1 (73)	85,15
5	-1,41 (5)	0 (55)	10,80
6	1,41 (11)	0 (55)	115,05
7	0 (7)	-1,41 (30)	31,15
8	0 (7)	1,41 (80)	39,50
9	0 (7)	0 (55)	35,85
10	0 (7)	0 (55)	35,65
11	0 (7)	0 (55)	35,85

A partir dos resultados apresentados no planejamento fatorial completo 2^2 para as variáveis de pH e temperatura (Tabela 39), foi observado a maior atividade de PME 115 U/mL no pH de 11 e temperatura de 55°C (Ensaio 6). No meio complexo foi a máxima atividade de PME de 26U/mL a 55°C e pH 11, sendo a mesma temperatura e pH ótimo, porém o resultado superior para o meio com utilização de resíduos.

A Tabela 40 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectinametilesterase a um nível de confiança de 95 %. A Equação 8 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade de PME em função da temperatura e pH dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 41) onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,98 e o F calculado 21,84 vezes maior que o valor tabelado, o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 27.

Tabela 40: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de PME.

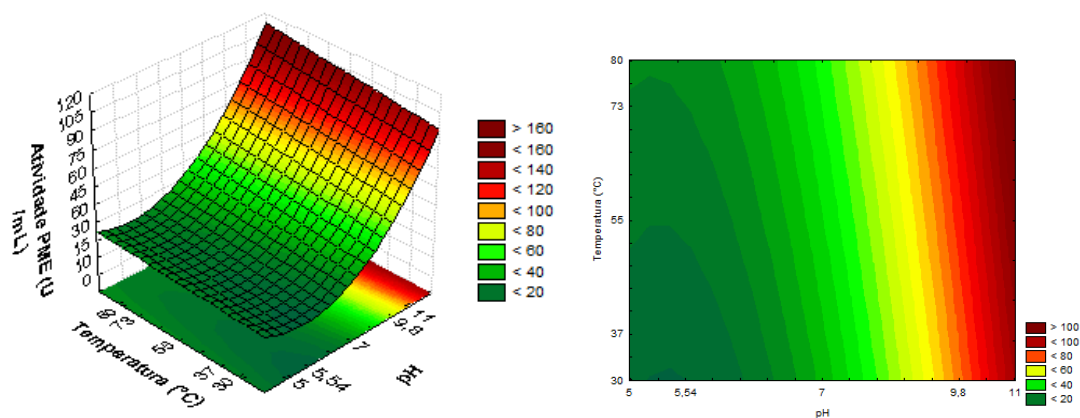
	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	35,78	0,066	536,74	0,000003
(1)pH (L)*	32,79	0,040	802,00	0,000002
pH (Q)*	13,70	0,048	280,90	0,000013
(2)Temperatura(L)*	4,46	0,040	109,23	0,000084
Temperatura(Q)	-0,17	0,048	-3,646	0,067660
1L by 2L*	1,13	0,057	19,70	0,002566

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)**Tabela 41:** Análise de variância para a atividade de PME do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	9898,79	4	2474,70	94,79
Resíduo	156,64	6	26,11	
Falta de Ajuste	156,61	4		
Erro Puro	0,03	2		
Total	10055,43	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}} = 4,34$

$$\text{PME (U/mL)} = 35,78 + 32,79 \cdot \text{pH} + 13,70 \cdot (\text{pH})^2 + 4,46 \cdot T - 0,17 \cdot (T)^2 + 1,13 \cdot 0,72 \cdot (\text{pH}) \cdot (T) \quad (8)$$

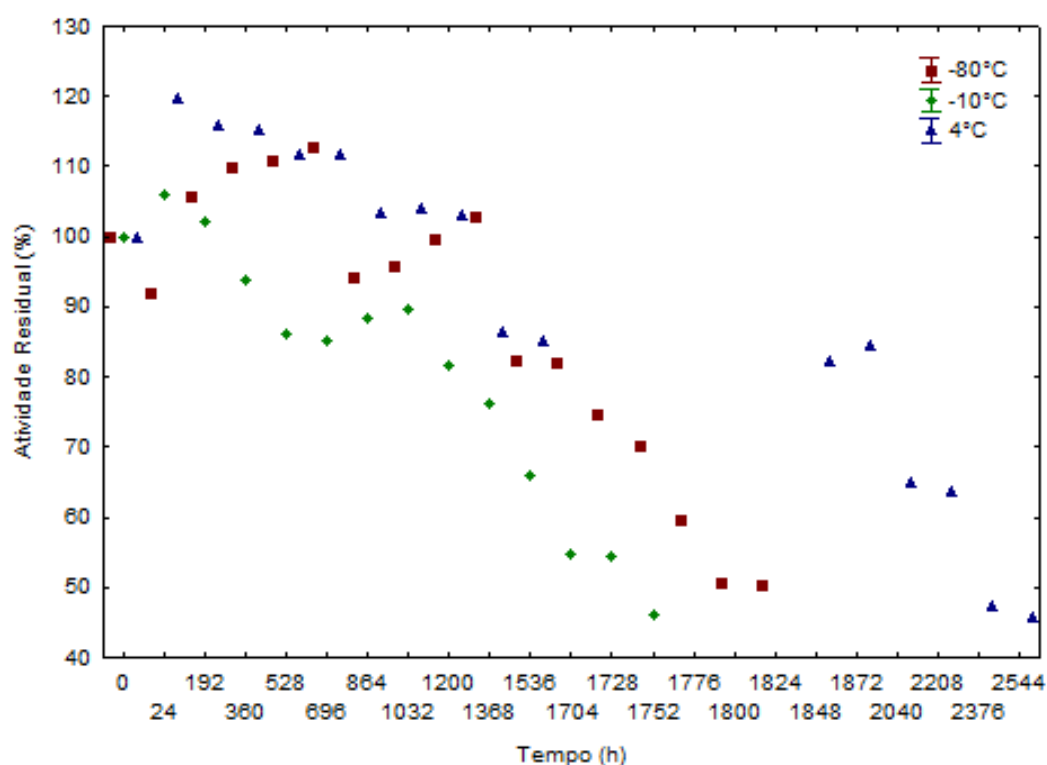
Onde: PME = Atividade de pectinametilesterase (U/mL); T = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)**Figura 27:** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PME (U/mL) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH, respectivamente.

Estabilidade térmica

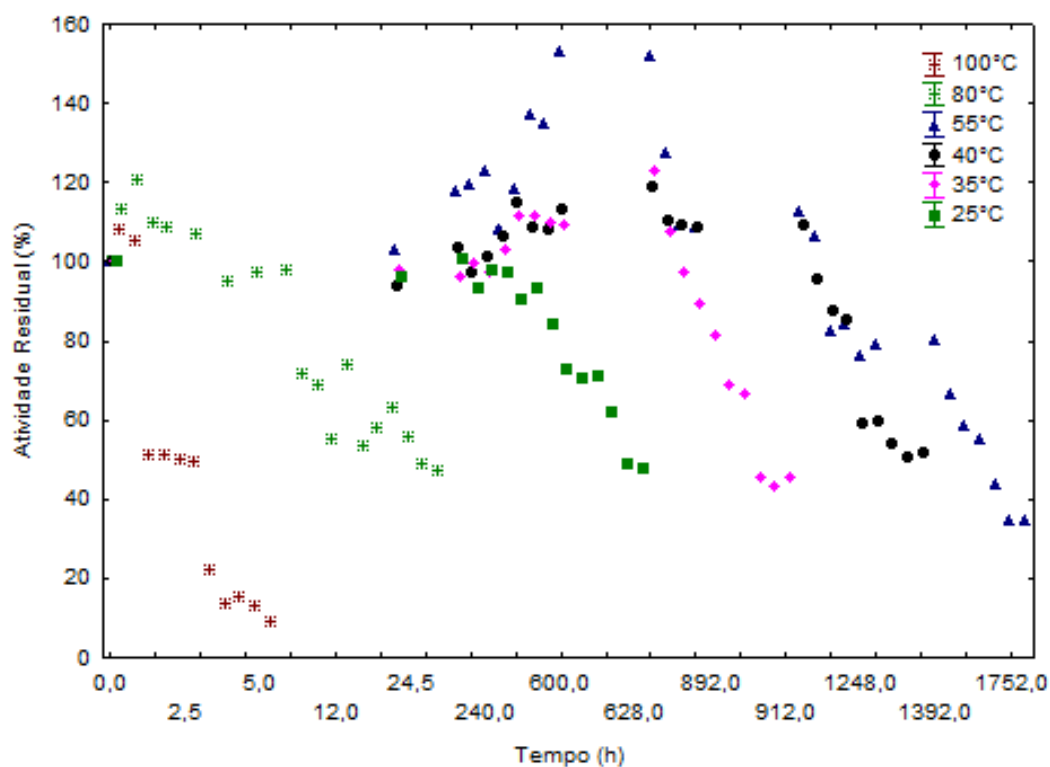
A avaliação da estabilidade térmica do extrato enzimático bruto da PME foi realizada incubando esta em diferentes temperaturas (-80, -10, 4, 30, 40, 50, 60, 70 e 100°C), acompanhando o comportamento em função do tempo. Verifica-se que, o extrato enzimático bruto quando estocado a temperatura de 4°C (Figura 28 a), apresenta um incremento da atividade de PME de aproximadamente 20 % em relação a atividade inicial, e após 1368 h ocorre uma redução de atividade atingindo 46 % em 2544 h. No entanto, para as temperaturas de -10 e -80°C observa-se que PME manteve sua atividade residual em 50 % por um período de aproximadamente 1728 e 1824 h, respectivamente.

A Figura 28 (b) demonstra o comportamento do extrato bruto da PME submetido a altas temperaturas (25, 35, 40, 55, 80 e 100°C), onde se verifica que para a temperatura de 100°C a enzima manteve sua atividade residual de 50 % por apenas 4 h, e na temperatura de 80°C foi de aproximadamente de 25 h. O extrato enzimático de PME foi mais estável quando armazenado a 55°C apresentando uma atividade residual de 50 % por um período de aproximadamente 1700 h.

Figura 28: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PME submetido a (a) baixas (4, -10 e 80°C) e (b) altas temperaturas.



(a)



(b)

A Tabela 42 apresenta os parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto de PME dentro do intervalo estudado as temperaturas foram mais estáveis a 40 e 55°C, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 80 h, respectivamente. O valor da energia de desativação foi de 13,9 kJ/mol.

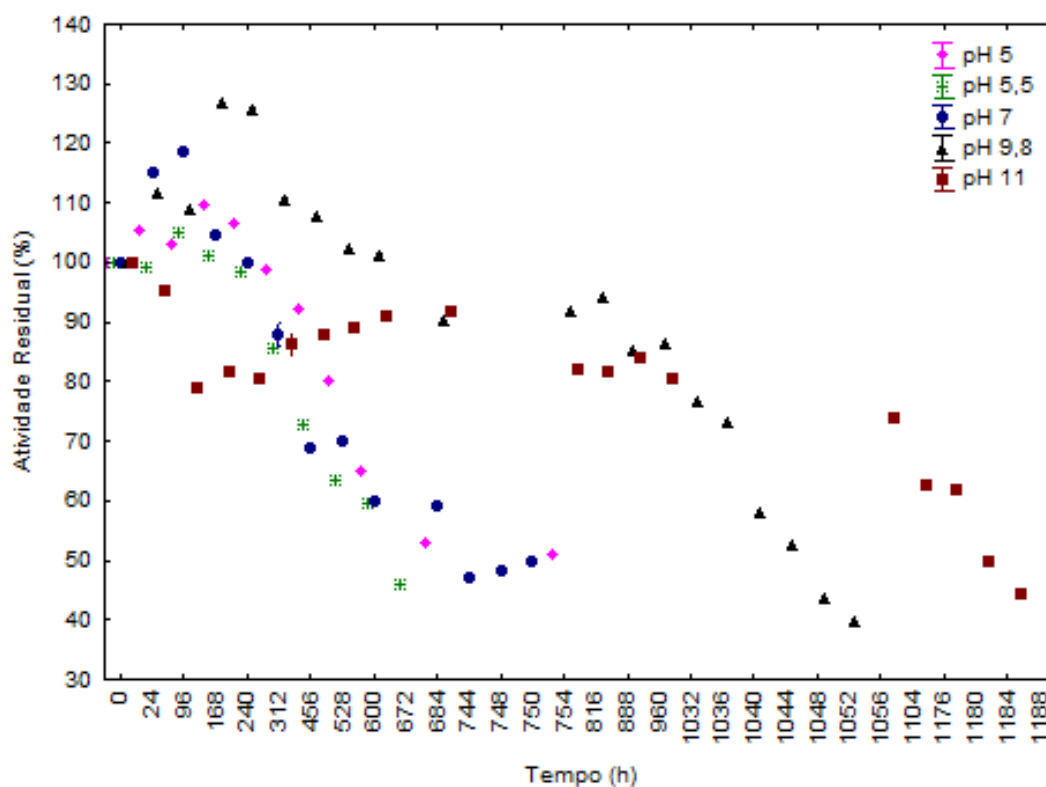
Tabela 42: Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da PME obtido pelo *A. niger* ATCC 9642.

Temperature (°C)	K (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
25	0,0001	80
35	0,001	8
40	0,0001	80
55	0,0001	80
80	0,031	0,26
100	0,237	0,03

Estabilidade em diferentes pH

A avaliação da estabilidade do extrato enzimático bruto da PME foi realizada incubando este em diferentes pH (5, 5,5, 7, 9,8 e 11) acompanhando o comportamento em função do tempo. Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade frente ao pH são apresentados na Figura 29. Verifica-se que a atividade residual (50 %) nos diferentes pH manteve-se estável pelo período de armazenamento de 1188 e 1040 h para os pHs 11 e 9,8, estando estes relaciondos a faixa de pH ótimo da enzima (Figura 29). Cardello & Lourenço (1992) avaliaram a estabilidade da PME de berinjela parcialmente purificada, após incubação durante 60 min e concluíram que a PME é estável em valores de pH na faixa de 5 a 8.

Figura 29: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PME submetido aos pH de 5, 5,5, 7, 9,8 e 11.



4.2.3. Pectina Liase (PMGL)

A Tabela 43 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade enzimática de PMGL e pH. A máxima atividade de PMGL foi de 32,94 U/mL (Ensaio 17), com meio de cultivo composto por 120 g/L de casca de laranja, 150 g/L de água de maceração de milho e 552 g/L de água de parboilização de arroz e nas condições de 180 rpm, 30°C, 120 h, 5×10^6 esporos/mL e pH_{inicial} 5,5.

Tabela 43: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 valores codificados (reais) e respostas em produção da enzima pectina liase e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Resposta	
	X_1	X_2	X_3	PMGL (U/mL)	pH
1	-1 (80)	-1 (60)	-1 (150)	5,59	4,98
2	1 (160)	-1 (60)	-1 (150)	21,36	5,05
3	-1 (80)	1 (240)	-1 (150)	8,09	5,85
4	1 (160)	1 (240)	-1 (150)	14,90	5,94
5	-1 (80)	-1 (60)	1 (450)	12,94	5,42
6	1 (160)	-1 (60)	1 (450)	20,82	4,93
7	-1 (80)	1 (240)	1 (450)	7,53	5,95
8	1 (160)	1 (240)	1 (450)	19,57	6,06
9	0 (120)	0 (150)	0 (300)	29,90	5,17
10	0 (120)	0 (150)	0 (300)	29,80	5,64
11	0 (120)	0 (150)	0 (300)	29,43	5,60
12	-1,68 (52,8)	0 (150)	0 (300)	17,36	5,40
13	1,68 (187,2)	0 (150)	0 (300)	32,94	5,77
14	0 (120)	-1,68 (0)	0 (300)	10,23	2,46
15	0 (120)	1,68 (301,2)	0 (300)	12,11	6,17
16	0 (120)	0 (150)	-1,68 (48)	26,37	5,68
17	0 (120)	0 (150)	1,68 (552)	32,94	5,61

* X_1 = Casca de Laranja (g/L), X_2 = Água de maceração de milho (g/L), X_3 = Água parboilizada de arroz (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, 120 h e pH_{inicial}= 5,5.

A Tabela 44 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da PMGL a nível de confiança de 95 %. As concentrações de casca de laranja, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz tiveram uma influência significativa ($p < 0,05$) sobre a atividade da PMGL. Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância ANOVA (Tabela 45).

Tabela 44: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de pectina liase.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
<i>Média</i>	30,22	0,1415	213,46	0,000022
(1)Casca de Laranja (L)*	5,03	0,0665	75,68	0,000175
Casca de Laranja (Q)*	-3,32	0,0732	-45,36	0,000486
(2)AMM (L)*	-0,54	0,0665	-8,23	0,014445
AMM (Q)*	-8,27	0,0732	-112,9	0,000078
(3)APA (L)*	1,60	0,0665	24,19	0,001704
APA (Q)*	-1,72	0,0732	-23,56	0,001796
1L.2L*	0,60	0,0868	-6,9	0,020352
1L.3L	-0,33	0,0869	-3,81	0,062405
2L.3L	-0,33	0,0869	-3,9	0,060183

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

Tabela 45: Análise de variância para a bioprodução de PMGL do planejamento fatorial completo 2^3 .

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	1178,67	7	168,38	6,76
Resíduo	224,14	9	24,90	
Falta de Ajuste	224,02	7		
Erro Puro	0,121	2		
Total	1402,81	16		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 3,29$.

A Equação 9 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da pectina liase em função das variáveis independentes (casca de laranja, água de maceração de milho e água parboilizada de arroz) dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde um coeficiente de correlação de 0.92 e F calculado 2,06 vezes maior que o F tabelado, permitindo a construção de superfície de resposta e curva de contorno (Figura 30).

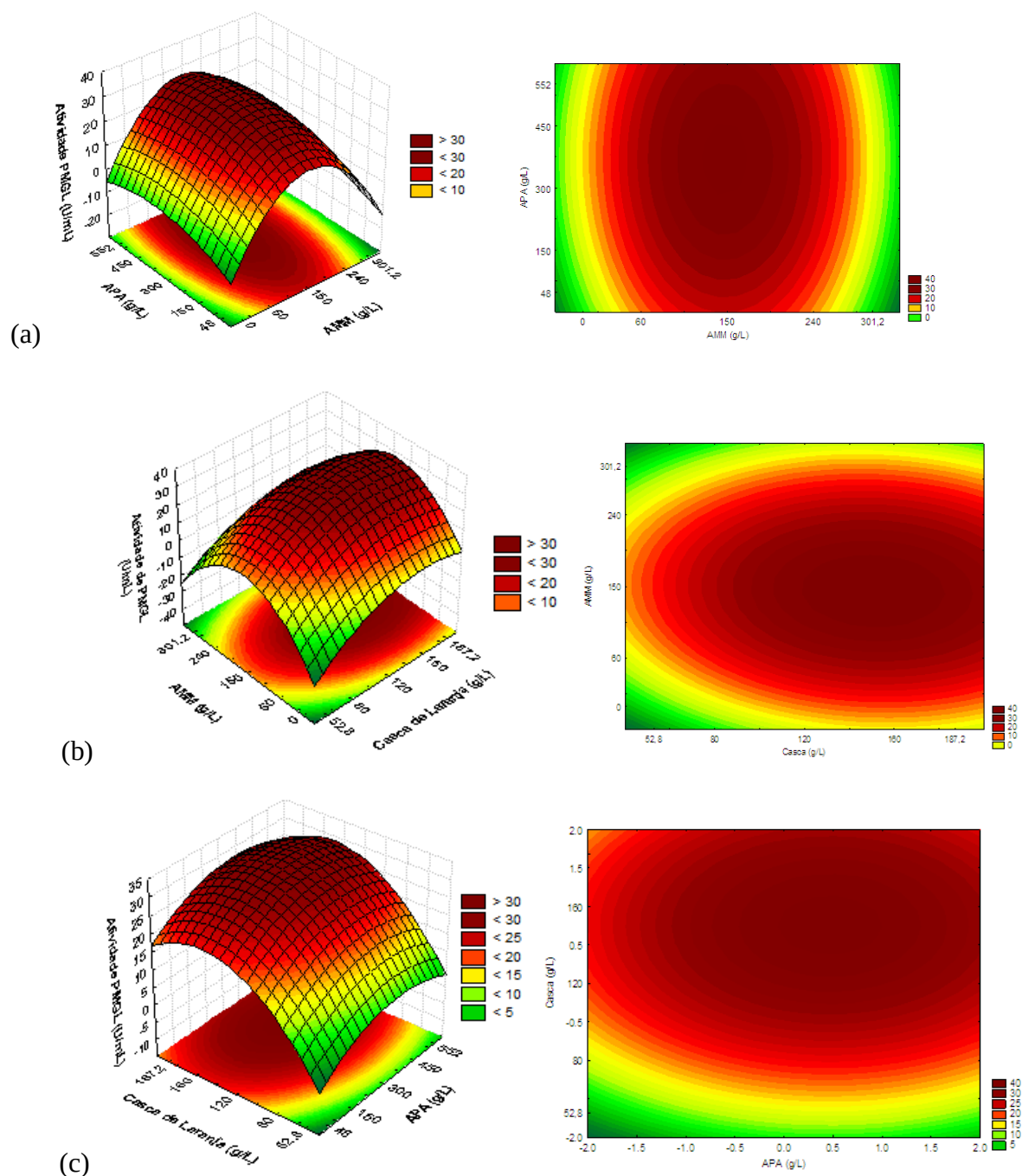
$$\text{PMGL (U/mL)} = 30,22 + 5,03.X_1 - 3,32.X_1^2 - 0,547.X_2 - 8,27.X_2^2 + 1,61.X_3 - 1,73.X_3^2 + 0,60X_1.X_2 \quad (9)$$

Onde : PMGL= Pectina Liase ; X_1 = Casca de Laranja ; X_2 = Água de maceração de milho ; X_3 = Água de parboilização de arroz

Analisando a Figura 30, verifica-se que a máxima atividade de PMGL (32,94 U/mL) encontra-se na faixa de concentração entre 120 -180 g/L de casca de laranja, 150 g/L de

água de maceração de milho e 300 g/L água de parboilização de arroz, caracterizando a otimização da bioprodução da PMGL em meio a base de resíduos agroindustriais.

Figura 30: Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração (a) água parboilizada de arroz e água de maceração de milho, (b) água de maceração de milho e casca de laranja e (c) água parboilizada de arroz e casca de laranja, respectivamente.



4.2.3.1. Estudo cinético de PMGL

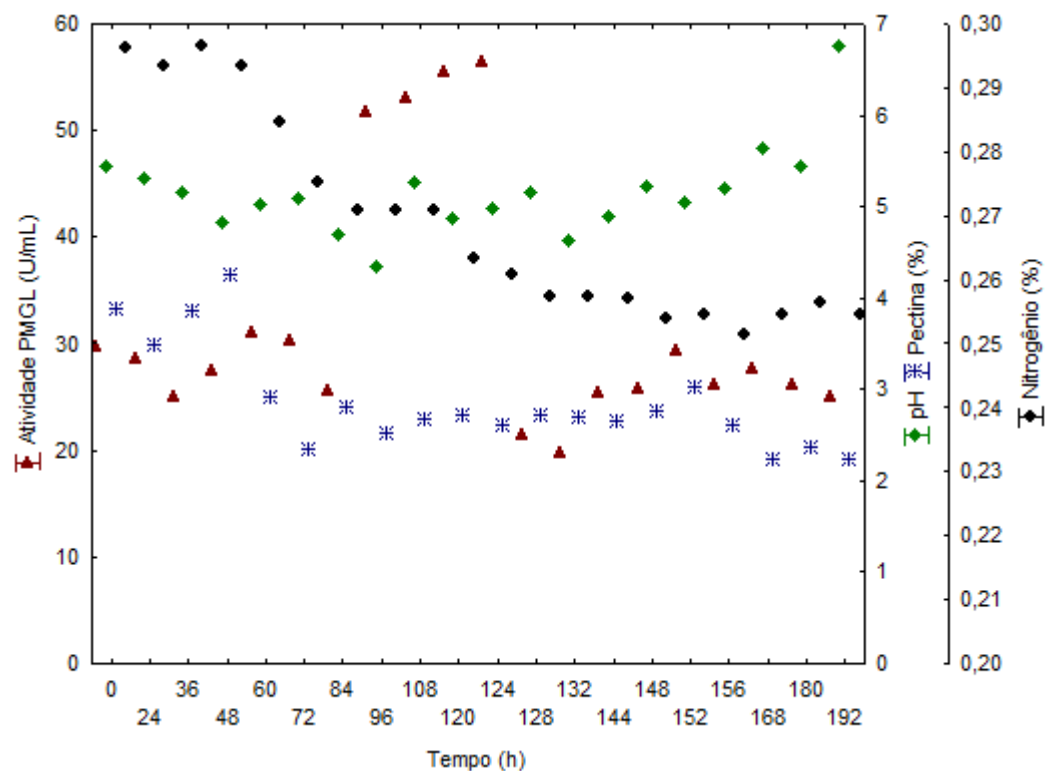
Para o estudo cinético de bioprodução de PMGL, consumo de substrato e pH (Figuras 30a e 30b) foram realizados a partir das condições experimentais maximizadas/otimizadas (casca de laranja 160 g/L, água de maceração de milho 150 g/L e água parboilizada de arroz 300 g/L, 5×10^6 esporos/mL, 30°C, 180 rpm e pH_{inicial} 5,5).

De acordo com a Figura 30a, observa-se que a atividade máxima de PMGL foi de 56 U/mL em 124 h de produção. O pH permaneceu praticamente estável (~5,5) com queda no período de maior atividade de bioprodução, com posterior acréscimo ao final da cinética 192 horas pH_{final} de 6,73.

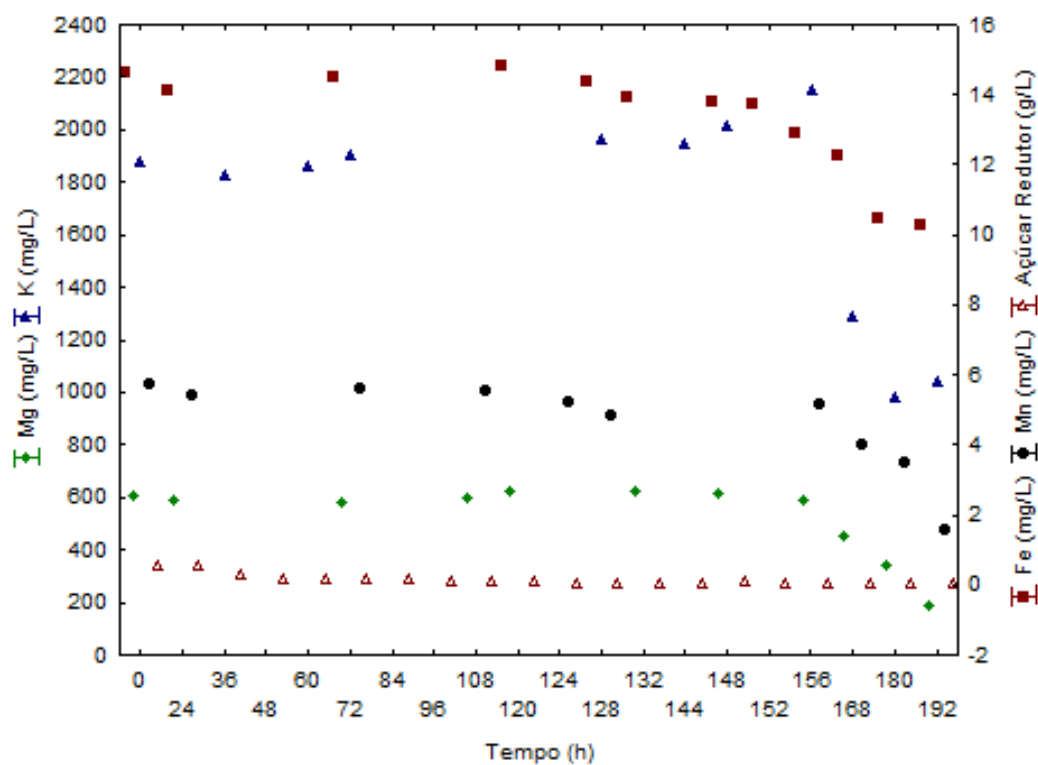
Ao analisar a assimilação dos substratos, observa-se que a pectina apresentou uma redução nas primeiras 72 h onde ocorrem as maiores produções de PMGL (Figura 31a), o nitrogênio (Figura 31a), teve uma redução maior em 72 h com consumo total ao final 192 h de 17%. O pH se mostra estável durante o período cinético, mas evidencia que ao final seu aumento é perceptível de 24% em relação ao inicial.

Das fontes de minerais (Figura 31b), o magnésio apresentou redução bastante significativa em relação ao valor inicial (603,01 mg/L) correspondendo a 68,82%, a maior oscilação foi para o manganês, correspondendo 72,12 % de consumo total. O potássio não se mostrou variável durante o maior período cinético, porém a partir das 168 horas ocorreu redução de 44,55%. Em relação ao açúcar redutor, obteve-se uma redução bastante significativa de 92,6% em relação ao valor inicial.

Figura 31: (a) Estudo cinético na bioprodução de PMGL (U/mL), pectina (%), evolução do pH e nitrogênio em função do tempo (h); (b) Cinética do consumo dos substratos consumo de K, Mg, Mn, Fe e açúcar redutor, em função do tempo (h).



(a)



(b)

4.2.3.2. Caracterização parcial da pectina liase

Temperatura e pH ótimos

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto de PMGL produzido em meio a base de resíduos agroindustriais a partir das condições maximizadas (160 g/L de casca de laranja, 150 g/L de água de maceração de milho, 300 g/L de água de parboilização de arroz, 5×10^6 esporos/mL, 30°C, 120 horas, pH_{Inicial} 5,5 e 180 rpm) foram definidos baseados em um planejamento de experimentos, sendo que a Tabela 45 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais). A máxima atividade enzimática da pectina liase foi de 48 U/mL (Ensaio 9), com pH 4,5 e temperatura de 55°C.

Tabela 45: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática de pectina liase em função de temperatura e pH.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Respostas
	pH	Temperatura (°C)	PMGL (U/mL)
1	-1 (3,4)	-1 (37)	29,08
2	1 (5,5)	-1 (37)	34,23
3	-1 (3,4)	1 (73)	14,64
4	1 (5,5)	1 (73)	16,90
5	-1,41 (3)	0 (55)	39,52
6	1,41 (6)	0 (55)	43,58
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	34,35
8	0 (4,5)	1,41 (80)	21,98
9	0 (4,5)	0 (55)	47,98
10	0 (4,5)	0 (55)	47,56
11	0 (4,5)	0 (55)	48,74

A Tabela 47 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade da pectina liase a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que as variáveis estudadas influenciaram na atividade da PMGL, sendo que pH e temperatura isolados apresentaram efeito positivo, porém a interação pH e temperatura foi negativo. Os fatores que não foram significativos foram adicionados á falta de ajuste para análise de variância - ANOVA (Tabela 48).

Tabela 47: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de PMGL em função de temperatura e pH.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	48,13	0,346	138,90	0,00005
(1)pH (L)*	1,64	0,213	7,75	0,01622
pH (Q)*	-6,09	0,254	-24,03	0,00173
(2)Temperatura(L)*	-6,16	0,213	-29,02	0,00118
Temperatura(Q)*	-12,82	0,253	-50,58	0,00039
1L.2L	-0,72	0,300	-2,41	0,137258

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 10 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de PMGL em função das variáveis analisadas (Temperatura e pH), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 48), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,90 e o F calculado de 1,63 vezes maior que o valor tabelado, o qual permitiu, também, a construção da superfícies de resposta e curva de contorno (Figura 32).

Tabela 48: Análise de variância para a atividade de PMGL do planejamento fatorial completo 2².

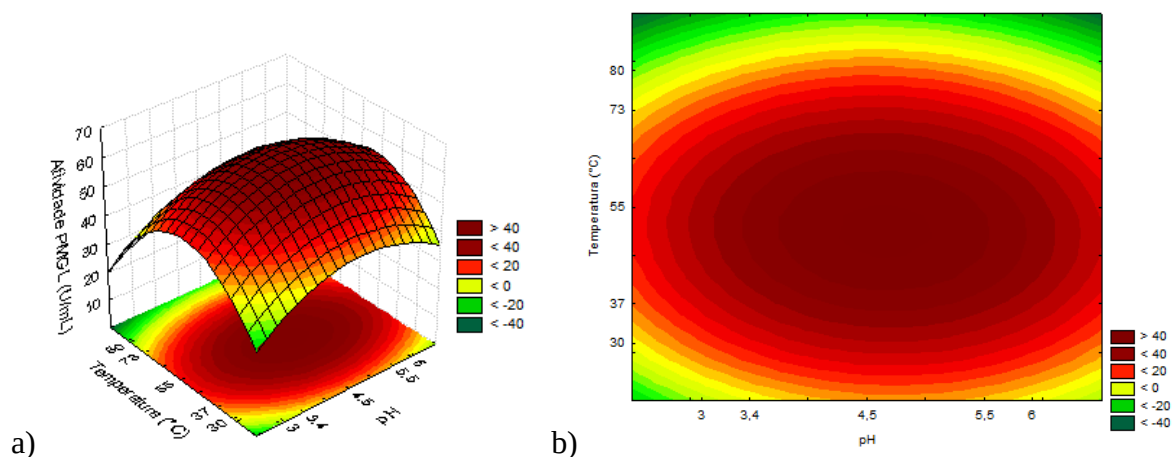
<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	1281,16	4	320,29	7,06
Resíduo	271,88	6	45,31'	
Falta de Ajuste	271,16	4		
Erro Puro	0,721	2		
Total	1553,03	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; F_{tab} = 4,53

$$\text{PMGL (U/mL)} = 48,13 + 1,64.\text{pH} - 6,09.(\text{pH})^2 - 6,16.T - 12,82.(T)^2 \quad (10)$$

Onde: PMGL = Atividade de pectina liase (U/mL); T = Temperatura (°C).

Figura 32: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de PMGL (U/mL) em função da temperatura (°C) e pH, respectivamente.

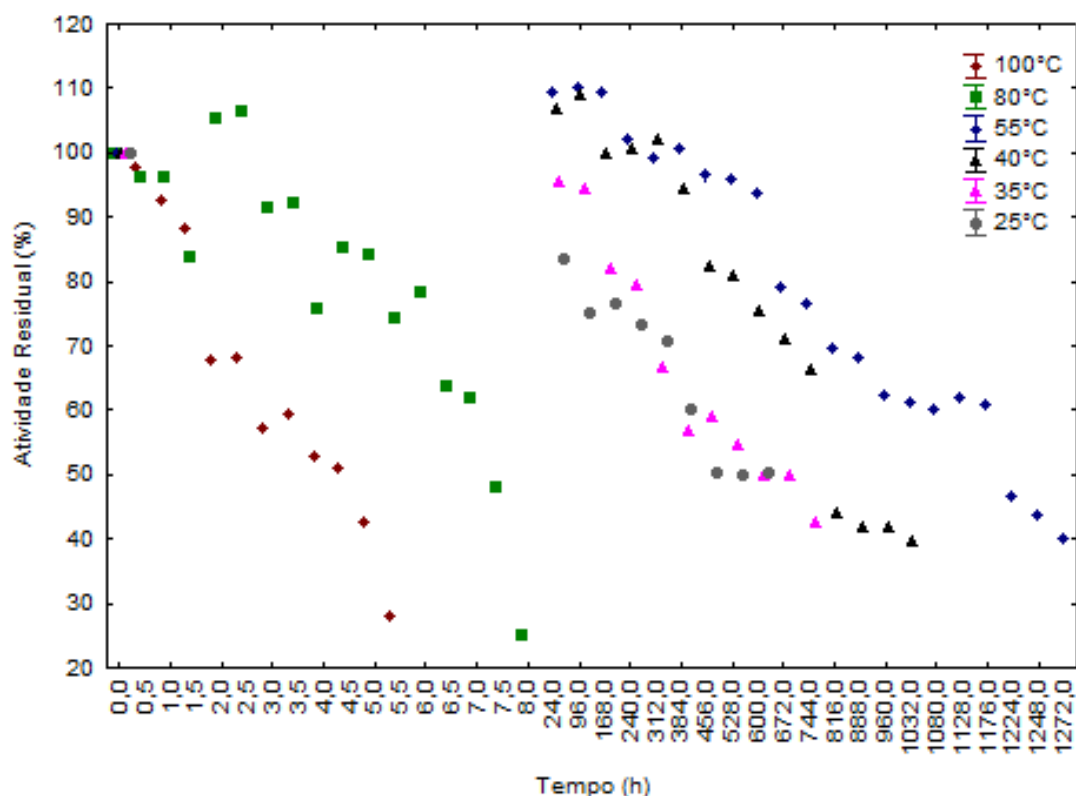


De acordo com a Figura 32, verifica-se que a atividade máxima de PMGL (48 U/mL) do extrato bruto obtido a partir de resíduos agroindustriais, encontra-se próxima ao ponto central de temperatura (55 °C) e pH (4,5).

Estabilidade térmica

A avaliação da estabilidade térmica (Figura 33) do extrato enzimático bruto da enzima PMGL, onde o mesmo foi incubado em diferentes temperaturas que variaram de 100°C a -80°C, e a pH variando de 3 a 9, acompanhando o comportamento de sua atividade em função do tempo. Verifica-se que para as altas temperaturas (100, 80, 55, 40, 35 e 25°C), o comportamento para a temperatura de 100°C foi de 53% de atividade em um tempo muito curto (4 h) em relação as demais temperaturas, visto que para temperatura de 55°C manteve sua atividade a 60% até o tempo de 1176 horas em um período total de 1272 horas com uma atividade residual de 40%.

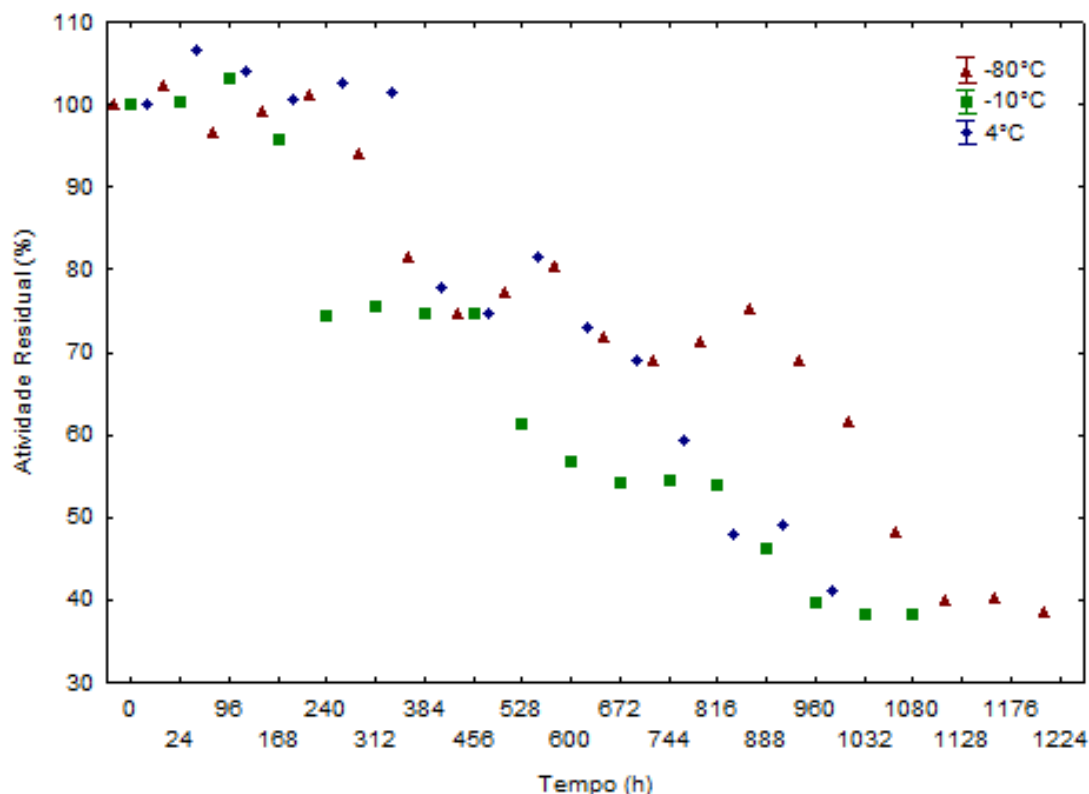
Figura 33: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL submetido a altas temperaturas 100, 80, 55, 40, 35 e 25°C.



Baixas temperaturas

O extrato enzimático bruto obtido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi armazenado a baixas temperaturas (4, -10 e -80°C). De acordo com os resultados apresentados na Figura 34, verifica-se que o extrato obtido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 9642 quando armazenado a -80°C apresentou atividade residual de aproximadamente 61% até o período de 1033 horas de armazenamento com posterior queda, o extrato enzimático armazenado a -10°C teve comportamento semelhante com atividade residual de 61,2%, porém em um período muito menor de 528 horas. E quando o armazenamento do extrato bruto é submetido a temperatura de 4°C, observa-se uma atividade relativamente significativa, em relação a temperatura de 10°C, onde atingiu sua atividade residual de 69% no período de 672 h.

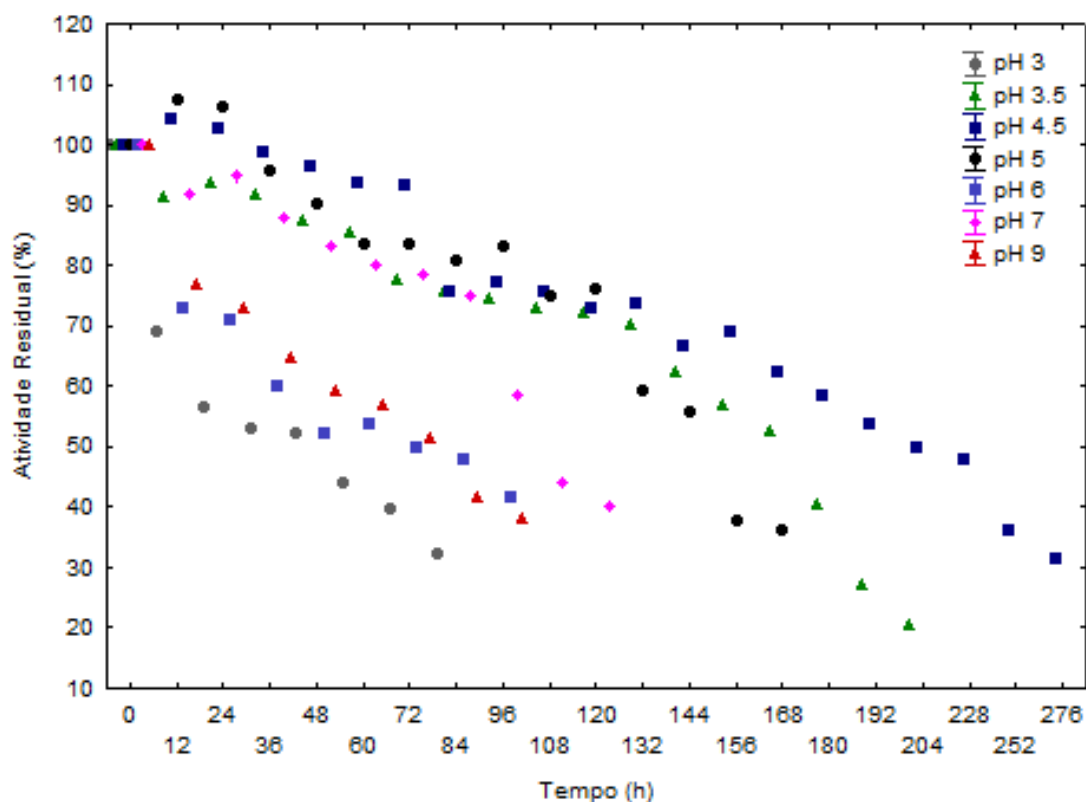
Figura 34: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL submetido a baixas temperaturas de 4, -10 e -80°C.



Estabilidade a diferentes pH

A avaliação da estabilidade do extrato enzimático bruto da PMGL foi realizada incubando esta a diferentes pH que variaram (3 - 9), acompanhando o comportamento em função do tempo. As amostras de cada ensaio foram coletadas nos tempos de zero (hora) até 276 horas para determinação da atividade de PMGL. Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade frente ao pH são apresentados na Figura 35. Verifica-se que a atividade residual nos diferentes pH manteve-se muito mais ativada em pH 4,5 que teve seu comportamento parcedido com o pH 3,5, porém permaneceu por um tempo maior de estocagem, de 276 horas

Figura 35: Estabilidade do extrato enzimático bruto da PME submetido a diferentes pH 3, 3,5, 4,5, 5, 6, 7 e 9 .



De modo a avaliar a estabilidade térmica da pectina liase obtido por *A. niger* ATCC 9642, os dados obtidos experimentalmente foram plotados como $\ln (A/A_0)$ como uma função do tempo. Seguindo este procedimento, a constante de desativação térmica (K_d) foi obtido para cada temperatura e apresentada na Tabela 49 . Uma representação gráfica de $\ln (K_d)$ como uma função de $1/T$ (K) foi usada para calcular a energia de ativação (E_d) para a reação de desativação, obtido o valor de 9,15 kJ / mol.

Tabela 49: Parâmetros de inativação térmica para o extrato bruto enzimático da PMGL obtido pelo *A. Niger* ATCC 9642.

Temperature (°C)	K (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
25	0,001	8
35	0,001	8
40	0,001	8
55	0,0001	80
80	0,078	0,10
100	0,100	0,08

Os resultados mostraram (Tabela 49), que dentro do intervalo estudado, a temperatura mais estável foi de a 55°C, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 80 h.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu avaliar a bioprodução das pectinases (exo-PG, PMGL, PME, PE e PGL), em frascos agitados por fermentação submersa com *A. niger* ATCC 9642, empregando meio complexo e composto por substratos agroindústrias. Além disso, propôs-se a caracterização parcial visando potencialidades de aplicações. A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

- ✓ A máxima produção de PME foi de 9,4 U/mL obtida em meio composto por 42 g/L de pectina cítrica, 1 g/L de sulfato de magnésio, 10 g/L de fosfato de potássio, nas condições de 180 rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5 e concentração de esporos de 5×10^6 esporos/mL em 72 h de bioprodução. A caracterização parcial do extrato enzimático bruto de PME apresentou condições de pH e temperatura ótimas de 11 e 55°C, respectivamente. A maior estabilidade foi obtida em pH 11 e temperatura de 55°C e 4°C de armazenamento. A energia de ativação (Ed) para a reação de desativação foi de 17,77 kJmol⁻¹, apresentando um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 35,05 h a 55°C .
- ✓ Um planejamento de segunda ordem permitiu a otimização da produção de PME a base de resíduos agroindustriais, sendo que a máxima produção foi de 130 U/mL com 120 g/L casca de laranja, 301,2 g/L água de maceração de milho e 600 g/L, em 124 h, 180 rpm, 30°C, pH_{inicial} 5,5 e 5×10^6 esporos/mL. O pH e a temperatura ótimos foi de 11 e 55°C, respectivamente. O extrato enzimático bruto manteve a maior estabilidade (50 % da atividade inicial) quando armazenados a 4°C durante 5376 h e em pH 11 por 1188 h, respectivamente. A energia de desativação (Ed) foi de 13,9KJ/mol, apresentando um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 80 h nas temperaturas de 40 e 55°C.
- ✓ A máxima de PMGL foi de 31 U/mL ao empregar 42 g/L de pectina cítrica, 40 g/L de extrato de levedura e 0,02 g/L de sulfato de ferro, a 180 rpm, 30°C, 100 h, pH_{inicial} 5,5 e 5×10^6 esporos/mL. O extrato enzimático bruto apresentou de pH e temperatura ótimos de 3,0 e 37°C, respectivamente. A estabilidade a baixas temperaturas (-80°C), manteve 50% de atividade por um período de aproximadamente 3336 h e a 55°C por cerca de 1656 h. No entanto, a estabilidade ao pH foi superior em pH 4,5 mantendo-se estável até 4128 horas. A energia de desativação (Ed) foi de 9,15kJ/mol, apresentando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 5,71 h a 55°C .

- ✓ Um modelo codificado de segunda ordem permitiu a otimização da bioprodução de PMGL empregando substratos agroindustriais, sendo que a máxima atividade foi de 56 U/mL com 160 g/L de casca de laranja, 150 g/L água de maceração de milho e 300 g/L de água de parboilização de arroz, a 180 rpm, 30°C e pH_{inicial} 5,5 e 5x10⁶ esporos/mL em 124 h. O pH e a temperatura ótimo do extrato enzimático bruto foi de 4,5 e 55°C, respectivamente. Ao armazenar os extratos enzimáticos a altas e baixas temperaturas e em diferentes pH verificou-se que a maior estabilidade ocorreu em -80°C e pH de 4,5, mantendo 50 % da atividade residual por 1200 e 228 h, respectivamente. A energia de desativação (Ed) foi de 9,15kJ/mol, apresentando um tempo de meia-vida (t_{1/2}) de 80 h a 55°C .
- ✓ Um planejamento de segunda ordem permitiu a otimização da produção de exo-PG a base de resíduos agroindustriais, sendo que a máxima produção foi de 1,85 U/mL ao utilizar 80 g/L de casca de laranja, 100 g/L de água de maceração de milho e 552 g/L de água de parboilização de arroz, 180 rpm, 30°C, 5x10⁶ esporos/mL e pH_{inicial} 5,5 em 128 h. O pH e a temperatura ótimos do extrato enzimático bruto foi de 5,5 e 37°C, respectivamente. O extrato enzimático manteve a estabilidade de 50 % da atividade enzimática quando armazenado a -80°C por 808 h e em pH 5 por 184 h, respectivamente. A energia de desativação (Ed) foi de 5,01 kJ/mol, apresentando um tempo de meia-vida (t_{1/2}) de 63 h a 40 e 55°C .
- ✓ Ao empregar um planejamento fatorial do tipo Plackett-Burman verificou-se baixas produções para as enzimas PE e PGL. A máxima atividade de PE foi de 0,43 U/mL em meio composto 2 g/L de pectina cítrica, 4 g/L de L-asparagina, 20 g/L extrato de levedura, 1 g/L de sulfato de magnésio, 0,02 g/L de sulfato de ferro em 72 h, 180 rpm, 30°C, 5x10⁶ esporos/mL e pH_{inicial} 5,5. Para a PGL a máxima atividade foi de 0,35 U/mL em meio com 22 g/L de pectina cítrica, 4 g/L de L-asparagina, 20 g/L extrato de levedura, 4 g/L de L-asparagina, 29 g/L extrato de levedura fosfato de potássio e 0,02 g/L de sulfato de ferro por 48 h, 180 rpm, 30°C, 5x10⁶ esporos/mL e pH_{inicial} 5,5.

Os resíduos agroindustriais, tais como a casca de laranja, água de maceração de milho e de parboilização de arroz, apresentam-se como potenciais substratos de produção de pectinases, sugerindo diferentes especificidades e propriedades das enzimas.

5.2 SUGESTÕES

- ✓ Imobilização das pectinases em suportes orgânicos e inorgânicos;
- ✓ Purificação das pectinases utilizando precipitação e ultra filtração;
- ✓ Aplicação dos extratos enzimáticos, livres e imobilizados, em reações de interesse industrial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, M.D. (1993). Waste water treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem. Eng. J.* 52: 49-58.
- ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J.; Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain *Process Biochemistry* Volume 40, Issue 5, April 2005, Pages 1937–1942.
- AMARAL, S. H.; ASSIS, S.A.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial Purification and Characterization of Pectin Methylesterase From Orange (*Citrus Sinensis*) Cv. Pera-Rio. *Journal of Food Biochemistry* 29, 367–380, 2005.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 33, (1), 21- 28, 1998.
- AYERS, W. A.; PAPAVIDAS, G. C.; DIEM, A. F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopatol.*, 56, 1006-1011, 1966.
- ASSIS, S. A.; FERREIRA B. S.; FERNANDES, P.; GUAGLIANONI, D.G., CABRAL J.M.S., OLIVEIRA, O.M.M.F. Gelatin-immobilized ectinametilsterase for production of low methoxyl pectina. *Food Chemistry* 86 (3), 333-337, 2004.
- ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; QUAGLIANONI, D.G.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial Purification and Characterization of Pectina Methylesterase from Acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4103–4107, 2002.
- BAI, Z. H., ZHANG, H. X., QJ, H.Y., PENG, X. W. e LI, B. J. Pectinase production by *Aspergillus niger* using waste water in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Tecnology*. 95 (1), 49-52. 2004.
- BARENSE, R.I. et al. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 327-330, Oct./Dec. 2001.
- BARNETT, H. L., BARRY, B. AND HUNTER, B. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society, New York, USA. (1998).
- BERKA, R.M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. *Biotechnology*, v.23, p.155-202, 1992.
- BASTOS, R.G. (2010). Tecnologia das fermentações: Fundamentos de bioprocessos. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos – Editora Universitária.

- BLANDINO, A., IQBALSYAH, T., PANDIELLA, S.S., CANTERO, D., WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 164–169, 2002.
- BENEN, J.A.; VISSER, J. Polygalacturonases. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. e Wong, D.W.S., Editors, 2003. Handbook of food enzymology, 69, 857-866, 2003.
- BERKA, R.M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In: BENNET J.W.; KLICH, M. A.; eds, *Aspergillus biology and industrial applications*. Boston. Butherworth- Heinemann, 28-53. 1992.
- BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L.; Ciênc. Agrotec. 24, 137, 2000.
- BRUMMELL, D. A. et al. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. Journal of Experimental Botany. v. 55, n.405, p.2029-2039, 2004.
- BUSTO, M.D.; García-Tramontín, K.E.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. (2006). Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. Bioresour. Technol. 97:1477-1483.
- CARDELLO, L., & LOURENÇO, E. J. Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from egg plant. Alim. Nutr., São Paulo, 4, 111-123, 1992.
- CARVALHO, H.A.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA A.B.; CARVALHO, H.S. Efeito da Atmosfera Modificada sobre Componentes da Parede Celular da Goiaba. Ciênc. agrotec., 25 (3), 605-615, 2001.
- CARVALHO, E. A. - Caracterização de pectinases obtidas a partir dos resíduos industriais da polpa do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Pérola. Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – Brasil, 2007.
- CASTILHO, L. R. Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. Dissertação Mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.
- CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, v. 71, p. 45-50, 2000.

- CATHARINA, L.M. Avaliação da produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
- COLET, R. Produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim), Erechim, 2012.
- COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F.; COURI, S. Partial purification of polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B. *Revista de Microbiologia*, v. 26, n.4. p. 318 – 322, 1995.
- CORDEIRO, C. A. M., MARTINS, M.L.L. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(1), 135-141, 2009.
- COURI S., Terzi S.C., Pinto G. A. S., Freitas S.P., Costa A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry* 36, 255–261, 2000.
- CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnology Progress*, v.29, n.4, p. 833-846, 2013.
- CHIN, L-H.; MOHD.ALI, Z.; LAZAN, H. Cell wall modification, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany*. 50 (335),767-775, june 1999.
- DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; BILIBIO, D.; SILVEIRA, M. M. E COSTA, J. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation. *Z. Naturforsch*, 57, 666-670, 2002.
- DA SILVA E. G., BORGES M. F., MEDINA C., PICOLLI R.H. and SCHWAN R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research* Volume 5, Issue 9, pages 859–865, June 2005
- DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase by slurry – state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 89 – 94, 2002.
- DHILLON, G. S. et al. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, v.47, p.542–548, 2012.

- DINU, D. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, UK, 6, 397 - 402, 2001.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIM, A.C.R., CHAVES-ALVES, V. M., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O., ARAUJO, E.F. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol.* 27,15-18, 1996.
- FONTANA, R.C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *A. oryzae*. *Bioresource Technology*.100, 4493-4498, 2009.
- FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. Anais. Recife: CD. 2005.
- FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. N.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 15, 107-115, 2003.
- GAVA, A. J. Princípios da Tecnologia de Alimentos. São Paulo. Ed. Nobel, 1998.
- GALIOTOU & PANAYOTOU, M. P. R.; KAPANTAI, M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17, 145–148, 1997.
- GARZO'N, C.G., HOURS, R.A., Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. *Bioresourc. Technology*. 39, 93–95; 1992.
- GERVAIS, P. MARECHAL, P.A. MOLIN, P. Water relations of solid state fermentation, *J. Sci. Ind. Res.* 55 (1996) 343–357
- GEÖCZE, M.L.A.; COELHO, J.L.C.; ARAÚJO, E.F.; SILVA, D.O. Effect of yeast extract and medium pH on polygalacturonase production by *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol.* 26, 165-168, 1994.
- GOMES J., ZENI J., CENCE K., TONIAZZO G., TREICHEL H., VALDUGA E. Evaluation of production and characterization of poligalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642. *Food and Bioproducts Processing*, 2011.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, 30 (1), 136–145, 2007.

- GONZALEZ, S.L., Determinação da atividade de Pectinametilesterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco de manga. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2009.
- GOSWAMI, S. et al. A review on production of echinocandins by *Aspergillus* sp. J. Biochem Tech. v.4, n.1, p. 568-575, 2012.
- GRADE, R.V., VAN DRIESSE, G., VAN BEEUMEN, J., BHAT, M.K., Purification, characterization and mode of action of an endopolygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. Enzyme Microb. Technol. 32, 321–330. 2003
- GUMMADI, S.N.; Manoj, N.; Kumar, D.S. (2007). Structural and biochemical properties of pectinases. In: Polania, J.; MacCabe, A.P. (Ed.). Industrial enzymes. Dordrecht: Springer. pp. 642.
- GUMMADI, S.N.; PANDA, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. Process Biochemistry. 38: 987-996.
- HADJ-TAIEB, N.; Ayadi, M.; Khelif, M.; Mrad, K.; Hassairi, I.; Gargouri, A. (2006). Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. Enzyme Microb. Technol. 39: 1072-1076.
- HENNIES, P. T. Produção de pectinases de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.
- HILTIN, H. O.; LEVINE, A. S. Pectin methylesterase in the ripening banana. Journal of Food Science, 30, 917-921, 1966.
- HOBSON, G. E. Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit. Biochemistry Journal. 86, 358-365, 1963.
- HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 409–418, 2002.
- HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties. Journal of Food Science, Chicago, 31 (3), 320-327, 1966.
- IANNETTA, P. P. M. et al. The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening. Physiologia Plantarum, 105, 338-347, 1999.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R.; Process Biochem. 40, 2931, 2005.

- YAO, J. et al. Production, characterization and applications of tannase. *Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic*, v.10, p. 137-147, 2014.
- JOHNSTON, J. W.; HEWETT, E. W.; HERTOOG, M. L. A. T. M. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 30, 145-160, 2002.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Appl. Sci. London*, 217-225, 2000.
- KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77, 215-227, 2001.
- KANT, S.; VOHRA, A.; GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*. V.88. p. 11-16. 2013.
- KAUR G., KUMAR S., SATYANARAYANA T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology* 94, 239–243, 2004.
- KOBAYASHI, T., HIGAKI, N., SUZUMATSU, A., SAWADA, K., HAGIHARA, H., KAWAI, S., ITO, S., Purification and properties of a highmolecular- weight, alkaline exopolygalacturonase from strain of *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 70–75. 2001.
- LIMA, Á.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydr. Polym.* 2005, 50, 63-68.
- LIMA, A. R. S., Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Amazonas- UFAM, 2006.
- LOTFY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*, v.98, n.18, p. 3464-3469, 2007.
- LOHANI, S.; TRIVEDI, P.K.; NATH, P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology* 31, 119-126, 2004.
- LOURENÇO, E. J.; CATUTANI, A. T. Purification and properties of pectinesterase from papaya. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 11201, 127, 1984.

- LY-NGUYEN, B.; LOEY, A.V.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; DUVETTER, T.; VU, S.T.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M.E. Strawberry Pectin Methylesterase (PME): Purification, Characterization, Thermal and High-Pressure Inactivation Biotechnol. Prog. 18 (6), 2002.
- MALAJOVICH, M.A. Biotecnologia. Rio de Janeiro: Axcel Books, 344 p. 2004.
- MALLER, A. Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus*. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, programa de pós-graduação em bioquímica, departamento de bioquímica e imunologia. Ribeirão Preto, 2008.
- MALVESSI, E., SILVEIRA, M.M. da. Influence of médium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Brazilian Archives of Biology and Tecnology, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, Sept. 2004.
- MARTINEZ-TRUJILLO, A.; Aranda J.S.; Gómez-Sánchez C.; Trejo-Aguilar B.; Aguilar-Osorio G. Constitutive and inducible pectinolytic enzyme ROM *Aspergillus flavipes* FP- 500 and their modulation by pH and carbon sourc. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 40, n.1, p. 40-47, 2009.
- MARTINS E. S.; SILVA D, DA SILVA R, LEITE RS, GOMES E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. Antonie Leew. 91, 291–9, 2007.
- MARTINS, N., *et al.*, Estudo do Tempo de Cultivo na Produção de Pectinases por *Penicillium* sp EGC5 e *Moniella* sp 9SB em Fermentação Semi-Sólida (FSS) de Resíduos Agrícolas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”-UNESP. Instituto de Biociências, Rio Claro- SP. 2006.
- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; da SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochem, 37 (9), 949-954, 2002.
- MATA-GOMEZ, M. et al. A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. Journal of Microbiology and Biotechnology, v.19, n.9, p.987- 996, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, 31, 426-428, 1959.
- MING CHU, I.; LEE, C.; LI, T. S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. Enzyme and Microbial Technology, 14 (4), 755-761, 1992.

- MOHAMED, S.A; FARID, N.M.; HOSSINY, E.N.; BASSUINY, R.I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. J. Biotechnol., 127(1), 54-64, 2006.
- MOHAMED, S.A., CHRISTENSEN, T.M.I.E., MIKKELSEN, J.D., New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. Carbohydr. Res. 338, 515–524, 2003.
- MOHSEN, S.M.; BAZARAA, W.A.; DOUKANI, K.. Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: 4° Conference on Recent Technologies in Agriculture. Anais. 805 – 817. Egito, 2009.
- MORAN, F., NASUNO, S., STAN, M.P. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminase of *Erwinia carotovora*. Arch. Biochem. Biophysic, 123, 298-306, 1968.
- MUNHOZ, C.L., SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J., SOARES-JÚNIOR, M.S. Extraction of pectin from dehydrated guava. Ciênc. Tecnol. Aliment. Vol, 30 nº1 Campinas Jan/Mar. 2010. Epub Mar 05, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010005000013>.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 16 (1), 57-67, 2003.
- NAIR, S.R.; PANDA, T. (1997). Statistical optimization of medium components from improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. Bioprocess Eng. 16: 169-173.
- NITURE S. K., KUMARB A. R., PARABC P. B., PANTA A., Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. Microbiological Research 163, 51—62, 2008.
- OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. Trends Biotechnol., 17, 13-21. 1999.
- Oliveira F.E.R.; Abreu C.M.P.; Asmar S.A.; Corrêa A.D.; Santos C.D.S. Firmeza de pêssegos ‘Diamante’ tratados com 1-MCP. Revista Brasileira de Fruticultura, 27 (3), 366-368, Dezembro, 2005.

- Olivier, M.N.; Cerutti, E.C.; Tomim, G.C.; Freitas, M.B.; Rotili, M.C.C.; Gregório, N.P. (2008). Aplicação da enzima pectinase na vinificação. Arq. Ciência Saúde Unipar. 12: 133-138.
- OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T.M.I.E.; HANSEN, K.P.; PALMQVIST, E.A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C- 30. Enzyme Microb. Technol. 33: 612-619.
- ORTEGA, N., *et al.*, Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. Food Chemistry, 88, 209–217, 2004.
- OUATTARA H.G., REVERCHON S., NIAMKE S. L., NASSER W. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. Food Microbiology 28, 1-8, 2011.
- PALMA, M. B. Produção de Xilases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. 2003. 169 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. Anais In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. 2003.
- PATRO, K. R. et al. Development of new medium composition for en d production of L-asparaginase by *Aspergillus* f. Journal of Environmental Biology, v.35, p.295-300, 2014.
- PAULA, E. M. Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*coffea arábica* L.). Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2001.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science, 77, 149-162, 1999.
- PATIL S.R., DAYANAND A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. Bioresource Technology 97, 2054–2058, 2006.
- PEDROLI, D.B. PEDROLI1 D.B., MONTEIRO A.C., GOMES E. AND CARMONA E.C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of

- microbial pectinolytic enzyme. The Open Biotechnology Journal, London, v.3, n.1, p. 9-18, Feb. 2009.
- PITT, M., Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: Methods Enzymol. 161, 350-354, 1988.
- PHUTELA, U; DHUNA, V; SANDHU, S E.; CHADHA, B. S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposting orange peels. Braz. J. Microbiol, 36 (1), 63-69, 2005.
- POLIZELI, M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Applied microbiology and biotechnology. 67 (5), 577-591. 2005.
- PRASANNA, *et al.* Pectic polysaccharides during ripening of mango (*Mangifera indica* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 1182-1186, 2003.
- QUIROGA EMMA N., SGARIGLIA MELINA A., MOLINA CÉSAR F., SAMPIETRO DIEGO A, SOBERÓN JOSÉ R., VATTUONE MARTA A. - Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*-mycological research, 113, 1404-1410, 2009.
- RAMANA-MURTHY, M.V.; KARANTH, N.G.; RAO, K.S.M.S.R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. In: Advances in Applied Microbiology: 38, 99-147, 1993.
- RESENDE, J.M.; CHITARRA, M.I.F.; MALUF, W.R.; CHITARRA, A.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. Horticultura Brasileira 22 (2), 206-212, 2004.
- SAINZ, RICARDO LEMOS, OLIVEIRA, CRISTIANE FABRES DE; VENDRUSCOLO, JOÃO LUIZ SILVA, ANTUNES, PEDRO L., BENDER, Carolina Irigoyen. Poligalacturonase e pectinametilesterase em pêssegos [*Prunus pérsica* (L.) Batsch] cv. Eldorado, 2007.
- SALES, A. N. de; BOTREL, N.; COELHO, A. H. R. Aplicação de 1-metilciclopropeno em banana ‘prata-anã’ e seus efeitos sobre as substâncias pécticas e enzimas pectinolíticas. Ciência e Agrotecnologia, 28 (3), 479-487, maio/jun., 2004.
- SANDRI, I.G., FONTANA, R.C., BARFKNECHT, M., MOURA DA SILVEIRA, M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases, LWT - Food Science and Technology. Doi: 10.1016/ j.lwt. 2011.02.008, 2011.

- SANTI, L. Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Biologia celular e molecular) UFRGS, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, 2005.
- SANTOS, S. F. M., Macedo G. R. , Silva F. L. H. , Souza R. L. A. e Pinto G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. *Química Nova*, 31 (8), 2008.
- SANTOS, S. F. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado em engenharia química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, Rio Grande do Norte, 2007.
- SCHMIDELL, W. & FACCIOITTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, V. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial*. Edgard Blucher LTDA. 2, 277-331, 2001.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, capítulo 1, p. 85-95, 1996.
- SILVA, D; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Braz. J. Microbiol*, 33 (4), 318-324, 2002.
- SHIVANNA, G. B.; VENKATESWARAN, G. Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. *The Scientific World Journal*, ID 392615, p. 1-6, 2014.
- SOUZA R. L.A., Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Campina Grande, 2008
- STROPARO, E. C., BEITEL, S. M., RESENDE, J. T. V., & KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(6), 2267-2278. 2012.
- SHULER, M.L. & KARGI, F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. New York: Prentice Hall, 2002.
- TARAGANO, V.M.; PILOSOFF, A.M.R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic

- activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 25, n. 305, p. 411-419, Aug. 1999.
- TARI CANAN, DOGAN NERGIZ, GOGUS NIHAN - Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae* - *Food Chemistry* 111, 824–829, 2008.
- TERZI, S. C.; CARVALHO, C. V. P.; OLIVEIRA, A. C. P.; COURI, S. Influência da variação da concentração de inoculo do *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção de enzima poligalacturonase. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Florianópolis, 2003.
- TERMOTE F.; ROMBOUTS F.M.; PILNIK, W. Stabilization of cloud in pectinesterase active orange juice by pectic acid hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry* 1, 15–34, 1977.
- TREVAN, M.D. *et al.* (Ed.). *Biotecnología: principios biológicos*. Zaragoza: Acribia, 1990.
- THOMPSON, W.; MEYER, S. Second generation biofuels and food crops: Co-products or competitors. *Global Food Security*, v. 2, p. 89-96, 2013.
- TRIBESS, T. B. Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- UEDA, S.; YUSAKU, F.; LIM, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. *Journal Applied Biochemical*, 4, 524-532, 1982.
- UENOJO, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.
- UENOJO, M.; PASTORE, Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives; *Química Nova*, 30 (2), 2007.
- USTOK F. I., TARI C., GOGUS N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 *Journal of Biotechnology* 127, 322–334, 2007.
- VALDUGA, E. ; TREICHEL, H.; VALERIO, A.; JACQUES, R.A.; FURIGO JÚNIOR, A.; LUCCIO, M. Di . Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. *Química Nova*, v. 30, p. 1860-1866, 2007.

- VISWNATHAN, R.; JAGADEESHBABU, P.E. Studies on the production of pectinase from tamarind kernel powder by submerged fermentation using *Aspergillus* species and optimization of medium using design expert. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, Lausanne, v. 22, n. 4, 481-489, 2008.
- VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J.F.; HOURS, R.A.; CASCONE, O. Spectrophotometric Method for Fungal Pectinesterase Activity Determination. *Technol. Argentina*, 26, 107-110, 1993.
- VIJAYALAKSHMI, S.; RANJITHA , J. Status of biogas – a critical review. *Universal Journal of Pharmacy Take Research to New Heights. Research and Green Technologies Center, VIT University, Vellore* ,2013.
- WANG Y. , WANGA Z., XU Q., DUA G., HUA Z., LIU L., LI J. , CHEN J., Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris* *Process Biochemistry*, 44, 949–954, 2009.
- ZENI, J. ; GOMES, J. ; AMBROZINI E. ; Toniazzi, Geciane ; Oliveira, Débora ; Valduga, Eunice . Experimental design applied to the optimization and partial characterization of pectin-methyl-esterase from a newly isolated *Penicillium brasilianum*. *African Journal of Biotechnolog*, v. 12, p. 5886-5896, 2013.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. *Process Biochemistry*, 33 (8), 323-329, 2000.

7. APÊNDICE

Apêndice I

Tabela 50 – Estudo cinético da produção de Pectinametilesterase (PME) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burman por um período de até 96 horas de bioprodução.

Ensaios	24 h	pH	48 h	pH	72 h	pH	96 h	pH
1	0.8	5.28	1.5	4.33	1.8	4.17	1.2	4.42
2	0.6	4.10	1.5	3.44	2	3.35	2.6	3.29
3	2.4	5.64	1.4	5.18	1.5	5.91	1.6	5.48
4	1.3	4.94	1.4	4.29	2	4.18	1.7	4.23
5	2	4.75	2.6	3.58	3.2	3.36	3.5	3.22
6	2.9	5.17	2.5	4.58	2	4.90	1.4	5.70
7	0.4	5.53	0.7	4.79	0.6	5.03	1.5	4.76
8	1.5	5.56	1.6	5.19	1.6	5.30	2.3	4.37
9	0.6	5.34	1.5	3.26	2.3	2.57	2.2	2.51
10	1.3	4.12	2.7	3.41	2.5	3.49	2.1	3.65
11	0.2	4.51	0.2	4.37	0.2	4.31	0.1	4.09
12	0.05	4.41	0.4	3.23	0.1	3.09	0.3	2.95
13	1.2	5.21	1.8	4.02	2.2	3.71	1.8	4.32
14	1.3	5.25	2	4.07	2.1	3.66	1.9	3.95
15	0.8	5.19	1.3	4.38	2.8	3.55	2.5	3.71

Apêndice II

Tabela 51– Estudo cinético da produção de Pectina liase (PMGL) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burman por um período de até 96 horas de bioprodução.

<i>Ensaio</i>	<i>Atividade de PMGL (U/mL)</i>							
	<i>24 h</i>	<i>pH</i>	<i>48 h</i>	<i>pH</i>	<i>72 h</i>	<i>pH</i>	<i>96 h</i>	<i>pH</i>
1	5.47	5.28	13.76	4.33	3.34	4.17	5.74	4.42
2	0.91	4.10	1.79	3.44	0.00	3.35	0.81	3.29
3	0.00	5.64	0.00	5.18	1.60	5.91	3.34	5.48
4	5.90	4.94	17.10	4.29	4.35	4.18	18.32	4.23
5	2.46	4.75	1.98	3.58	0.97	3.36	4.81	3.22
6	4.18	5.17	11.26	4.58	0.00	4.90	17.28	5.70
7	0.94	5.53	1.49	4.79	4.76	5.03	0.00	4.76
8	0.00	5.56	0.77	5.19	9.34	5.30	1.33	4.37
9	0.47	5.34	0.00	3.26	11.79	2.57	0.00	2.51
10	1.67	4.12	2.59	3.41	2.87	3.49	6.70	3.65
11	5.21	4.51	0.00	4.37	17.70	4.31	0.52	4.09
12	0.20	4.41	1.14	3.23	0.61	3.09	0.41	2.95
13	3.84	5.21	7.26	4.02	8.80	3.71	1.82	4.32
14	1.93	5.25	7.80	4.07	2.05	3.66	5.27	3.95
15	0.00	5.19	7.53	4.38	4.60	3.55	10.69	3.71

Apêndice III

Tabela 52 – Estudo cinético da produção de Pectato Liase (PGL) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burman por um período de até 96 horas de bioprodução.

<i>Ensaio</i>	<i>Atividade de PGL (U/mL)</i>							
	<i>24 h</i>	<i>pH</i>	<i>48 h</i>	<i>pH</i>	<i>72 h</i>	<i>pH</i>	<i>96 h</i>	<i>pH</i>
1	0	5.28	0.0158	4.33	0.0305	4.17	0	4.42
2	0	4.10	0	3.44	0	3.35	0	3.29
3	0	5.64	0.0364	5.18	0.0161	5.91	0	5.48
4	0	4.94	0.1280	4.29	0	4.18	0	4.23
5	0	4.75	0	3.58	0.0103	3.36	0	3.22
6	0	5.17	0.3463	4.58	0.0680	4.90	0.0626	5.70
7	0	5.53	0	4.79	0.2901	5.03	0	4.76
8	0	5.56	0	5.19	0.0727	5.30	0.1056	4.37
9	0	5.34	0	3.26	0	2.57	0.0363	2.51
10	0	4.12	0	3.41	0.0221	3.49	0	3.65
11	0	4.51	0	4.37	0	4.31	0.0156	4.09
12	0	4.41	0	3.23	0.0011	3.09	0.0419	2.95
13	0	5.21	0.0335	4.02	0	3.71	0	4.32
14	0	5.25	0.0615	4.07	0.0053	3.66	0	3.95
15	0	5.19	0	4.38	0	3.55	0.0160	3.71

Apêndice IV

Tabela 53 – Estudo cinético da produção de Pectina esterase (PE) em todos os ensaios do planejamento tipo Plackett & Burman por um período de até 96 horas de bioprodução.

<i>Ensaio</i>	<i>Atividade de PE (U/mL)</i>							
	<i>24 h</i>	<i>pH</i>	<i>48 h</i>	<i>pH</i>	<i>72 h</i>	<i>pH</i>	<i>96 h</i>	<i>pH</i>
1	0.0171	5.28	0.0600	4.33	0.0003	4.17	0.0171	4.42
2	0.0006	4.10	0.0004	3.44	0.0025	3.35	0.0086	3.29
3	0.0013	5.64	0.0002	5.18	0.0043	5.91	0.0343	5.48
4	0.0085	4.94	0.0026	4.29	0.0043	4.18	0.0051	4.23
5	0.0085	4.75	0.0060	3.58	0.0077	3.36	0.006	3.22
6	0.0171	5.17	0.0017	4.58	0.0171	4.90	0.0171	5.70
7	0.0085	5.53	0.0429	4.79	0.4300	5.03	0.4285	4.76
8	0.0042	5.56	0.0257	5.19	0.4285	5.30	0	4.37
9	0.0085	5.34	0.0343	3.26	0.0086	2.57	0.0043	2.51
10	0.0171	4.12	0.0257	3.41	0.0171	3.49	0.0069	3.65
11	0.0060	4.51	0.0051	4.37	0.0017	4.31	0.0077	4.09
12	0.0171	4.41	0.0017	3.23	0.0001	3.09	0.0034	2.95
13	0.0342	5.21	0.0026	4.02	0.0085	3.71	0.0086	4.32
14	0.0428	5.25	0.0051	4.07	0.0085	3.66	0.0171	3.95
15	0.0085	5.19	0.0171	4.38	0.0077	3.55	0.0034	3.71