Dênis Silva

Estudo da produção de pectinases por Penicillium viridicatum RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

1910001156

Dênis Silva

Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum RFC3* através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto - SP, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de alimentos (Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientador: Profª. Drª. Eleni Gomes

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

TJ156/03

São José do Rio Preto, Fevereiro de 2003.

664.578.15
S586e

50701037

Silva, Dênis.
Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos de resíduos agrícolas – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
198 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Fermentação. 4. Enzimas de fungos. 5. Enzimas - Aplicações industriais. 6. Pectinase. 7. Proteínas - Separação. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.1

BIBLIOTECA

Dênis Silva

Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum RFC3* através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas

Banca Examinadora

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Profª. Drª. Eleni Gomes:
Orientador

Drª. Deise Maria Fontana Capalbo
2° Examinador

Prof. Dr Crispin Humberto Gracia-Cruz
3° Examinador

DADOS CURRICULARES

DÊNIS SILVA

Nascimento	13/03/1977 - Birigui/SP
Filiação	Antonio Cardoso Silva Sonia Aparecida Frazatti Silva
1997/2000	Curso de Graduação - Licenciatura em Ciências Biológicas, no Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE) - UNESP, São José do Rio Preto - SP
2001/2003	Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível de Mestrado, no Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE) - UNESP, São José do Rio Preto - SP
2003/...	Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Microbiologia Aplicada, nível de Doutorado, no Instituto de Biociências - UNESP, Rio Claro - SP

"É impossível proceder ao infinito na série dos seres que se geram sucessivamente. Deve-se admitir, por isso, que existe um ser necessário que tenha em si toda a razão de sua existência, e do qual procedam todos os outros seres. A este chamamos Deus." (S. Tomás de Aquino)

Este trabalho é dedicado:

Aos meus pais, Antonio e Sonia, e a minha irmã Daniele, pelo grande incentivo e apoio, dedicação e abnegações de uma vida para que eu chegasse onde eles jamais puderam chegar.

Aos meus avós...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que nos momentos de tristeza e dificuldade, foi meu alicerce, a causa e a conseqüência deste trabalho...

A Profª. Drª. Elení Gomes, orientadora e amiga, que me mostrou que a melhor de todas as sortes é atraída com o trabalho e que devemos sempre estudar não para saber muitas coisas, mas para sabê-las bem... obrigado pela confiança!

Ao Prof. Dr. Roberto Da Silva pelo apoio e disposição em sempre ajudar a esclarecer as dúvidas cotidianas.

A Sabrina pelo carinho e incentivo de todas as horas nesta etapa final...

Aos colegas e amigos de Laboratório, Alessandra, Márcia M., Daní, Valquíria, Ellen, Tatiane, Caio, Heloíza, Maricy, Tony, Ana Paula, Simone, Eduardo, Carla, Rodrigo, Solange, Gisele, Natalia, Kivia e Márcia Rizzatto, tão diferentes e singulares entre si, meu muito obrigado por serem minha família, pelo auxílio nas dúvidas de bancada e pelas proveitosas discussões na nossa laboração diária.

Aos professores e amigos do Curso de Fermentação Semi-sólida, coordenado pela Drª. Deise, pela paciência e dedicação em esclarecer minhas duvidas, foram muito importantes e responsáveis em grande parte por nutrir e ascender meu interesse e satisfação em trabalhar com processos fermentativos.

A família Pagotto, nas figuras de seu Paulo e D. Eddy (in memorian), por me receber em seu lar ao longo destes 6 anos de minha vida, me acolhendo com toda ternura, meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron pelo empréstimo da lâmpada UV, imprescindível para as análises de micotoxinas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, doando seu tempo e seus conhecimentos, minhas sinceras saudações.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por acreditar neste trabalho e viabiliza-lo através da concessão da bolsa de auxílio à pesquisa e da reserva técnica.

"O mal de quase todos nós é que preferimos ser arruinados pelo elogio a ser salvos pela crítica". (Norman Vincent)

unesp

I - RESUMO 1

II - ABSTRACT 4

III - INTRODUÇÃO 7

IV - OBJETIVOS 9

IV.1. Gerais 9

IV.2. Específicos 9

V - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 10

1. FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA 10

1.1 Fatores que afetam o crescimento microbiano e produção de enzimas em FSS 11

1.2 Tipos de substratos utilizados na FSS 14

1.3 Vantagens e desvantagens da FSS 18

1.4. Reatores utilizados na FSS 20

a) reatores de vidro 20

b) embalagens plásticas 21

c) bandejas 21

d) tanques circulares 22

e) tubular horizontal 22

f) tubular vertical 23

2. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM FSS *23*

2.1. Degradação de micotoxinas e compostos secundários por microrganismos durante processos fermentativos 26

3. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS *27*

3.1. Estrutura da pectina 27

3.2. Enzimas pectinolíticas 30

a) pectina esterase (PE) 30

b) poligalacturonase (PG) 30

c) polimetilgalacturonato liase (PMGL) 31

d)poligalacturonato liase (PGL) 31

e) protopectinases 32

3.3. substratos utilizados para a produção de pectinases 33

3.4. Aplicação de pectinases 34

VI - CAPITULO I: PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Penicillium viridicatum* RFC3 ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS 41

1. INTRODUÇÃO 41

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 43

3. MATERIAL E MÉTODOS 44

1. microrganismo 44

2. Meios de cultivo 44

2.1. Meio de manutenção 44

2.2. Meio para o estudo da produção da enzima 44

3. Análise do substrato 45

3.1. Determinação da umidade do substrato 45

3.2. Determinação dos açúcares redutores 46

4. Inóculo 46

5. Estudo da produção da enzima em fermentação semi-sólida 47

6. Medida da atividade enzimática 47

6.1. Atividade da poligalacturonases (PG) 47

6.2. Atividade da pectina liase (PL) 48

7. Análise estatística dos experimentos 48

4 - Resultados 50

1. Análise do substrato a ser utilizado durante a fermentação 50

2. Produção de poligalacturonase e pectina liase em resíduos agro-industriais e analise fatorial dos dados 50

2.1. Exo-Poligalacturoanse 51

2.2. Pectina Liase 54

2.3. Combinação dos resíduos com bagaço de cana como substrato inerte 57

2.3.1. Produção de Exo-Poligalacturonase 57

2.3.2. Produção de Pectina Liase 60

5. DISCUSSÃO 64

6. CONCLUSÕES 68

VII - CAPITULO II: FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE FARELO DE TRIGO E BAGAÇO DE LARANJA EM ERLENMEYERS E EMBALAGENS DE POLIPROPILENO PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Penicillium viridicatum* RFC3. 69

1. INTRODUÇÃO 69

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 72

3. MATERIAL E MÉTODOS 73

1. microrganismo 73

2. Meios para o estudo da produção da enzima 73

3. Análise do substrato 73

3.1. Determinação do teor de cinzas 73

4. Inóculo 74

5. Estudo da produção da enzima em fermentação semi-sólida 74

5.1. Estudo da extração das enzimas 76

5.2. Quantificação dos açúcares, pH e proteínas presentes durante a fermentação 76

6. Medida da atividade enzimática 77

6.1. Atividade da poligalacturonase (PG) 77

6.2. Determinação da atividade da Endo-Poligalacturonase (Endo-PG) 77

6.3. Atividade da Pectina liase (PL) 78

6.4. Atividade da Pectina Esterase (PE) 78

6.5. Atividade de Amilase 78

6.6. Atividade de Xilanase 79

6.7. Atividade da CMCase 79

6.8. Atividade de Protease 79

7. Análise estatística dos experimentos 80

4. RESULTADOS 81

1. Análise do substrato a ser utilizado durante a fermentação 81

2.Estudo da produção das enzimas em FSS em diferentes biorreatores 81

2.1. Ensaios para a extração das enzimas 81

2.2. Quantificação dos açúcares redutores e totais e determinação de proteína ao longo do período fermentativo 82

3. Produção das enzimas (análise estatística) 86
3.1. Exo-Poligalacturoanse 86
3.1.1. Fermentação em Erlenmeyers 86
3.1.2. Fermentação em Embalagens de polipropileno 89
3.2. Produção de Endo-Poligalacturonase 92
3.2.1. Fermentação em Erlenmeyers 92
3.2.2. Fermentação em Embalagens de polipropileno 94
3.3. Pectina Liase 98
3.3.1. Fermentação em Erlenmeyers 98
3.3.2. Fermentação em Embalagens de polipropileno 103
4. Estudo da Produção de outras enzimas despolimerizantes por *Penicillium viridicatum RFC3* 105
5. DISCUSSÃO *108*
6. CONCLUSÕES

VIII - CAPITULO III: SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PECTINASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *P. viridicatum RFC3*. 109

1. INTRODUÇÃO *109*
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS *111*
3. MATERIAL e MÉTODOS *112*
1. microrganismo 112
2. Meios de cultivo 112
3. Produção da enzima em fermentação semi-sólida 112
4. Quantificação de proteínas 112
5. Medida da atividade enzimática 113
6. Separação das frações enzimáticas 113
6.1. Concentração da solução enzimática bruta 113
6.2. Separação das frações por filtração em gel sephadex G-50 114
7. Caracterização físico-química dos experimentos 114

7.1. Determinação do pH e temperatura ótimos 114

7.2. Determinação da estabilidade térmica e estabilidade frente ás variações de pH 115

8. Testes de especificidade pelo substrato 115

9. Efeito dos íons na atividade enzimática 116

10. Análise dos produtos da reação 116

4. RESULTADOS *117*

1. Separação das frações enzimáticas 117

2.Caracterização físico-química das frações coletadas 120

3. Especificidade pelo substrato 124

3.1. Exo-Poligalacturoanse 125

4. Efeito dos íons na atividade das pectinases 126

5. Análise dos produtos de hidrólise enzimática 128

5. DISCUSSÃO *131*

6. CONCLUSÕES

IX - CAPITULO IV: ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA BRUTA NO PROCESSAMENTO DE SUCOS: APLICAÇÃO DE PECTINASES NA EXTRAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS E VEGETAIS E AVALIAÇÃO DAS MICOTOXINAS PRODUZIDAS PELO *P. viridicatum RFC3* **132**

1. INTRODUÇÃO *132*

1.1. Efeitos negativos da Ocratoxina A e Aflatoxinas em animais monogástricos e poligástricos *134*

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS *137*

3. MATERIAL e MÉTODOS *138*

1. Medida da atividade enzimática 138

1.1. Atividade de polialacturonase (PG) 138

1.2. Determinação da atividade de Endo-Poligalacturonase 138

1.3. Atividade de Pectina liase (PL) 138

1.4 Atividade de Pectina Esterase (PE) 138

1.5. Atividade de amilase 139

1.6. Atividade de Xilanase 139
1.7. Atividade de CMCase 140
2. Aplicação da enzima na extração e clarificação de suco 140
3. Otimização do processo de extração do suco 143
4. Testes para quantificação de micotoxinas 143
4.1. Quantificação de Aflatoxinas 143
4.2. Quantificação de Ocratoxinas totais 144
4. RESULTADOS *146*
1. Uso de enzimas na extração de sucos 146
1.1. Extração de suco de banana 147
1.2. Extração de suco de maçã 151
1.3. Extração de suco de cenoura 156
2. Testes de micotoxinas 159
5. DISCUSSÃO *161*
6. CONCLUSÕES *165*
X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **166**
XI - APÊNDICE **191**

A. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da molécula de pectina parcialmente esterificada (Serra *et al.*, 1992). 29

Figura 2: Ação das pectinases sobre as substâncias pécticas (Serra *et al.*, 1992). 32

Figura 3: Produção de Pectina liase (PL) (□) e Exo-Poligalacturonase (Exo-PG) (■), por *Penicillium viridicatum RFC3* cultivado em meio de Bagaço de Laranja combinado com Farelo de Trigo (1:1 - p/p). 63

Figura 4: Biorreatores utilizados na fermentação semi-sólida por *Penicillium viridicatum RFC3*. Embalagem de polipropileno (A) e Erlenmeyer (B). 75

Figura 5: Teores de açúcares presentes no substrato fermentado pelo *P. viridicatum RFC3* em embalagens de polipropileno. Umidade de 70%: Açúcares Redutores(■) e açúcares Totais (◆). Umidade de 80% Açúcares Redutores(□) e açúcares Totais (◇). pH do meio a 70% (▲) e 80% (△) de umidade. 84

Figura 6: Teores de açúcares presentes no substrato fermentado pelo *P. viridicatum RFC3* em erlenmeyers. Umidade de 70%: Açúcares Redutores(■) e açúcares Totais (◆). Umidade de 80% Açúcares Redutores(□) e açúcares Totais (◇). pH do meio a 70% (▲) e 80% (△) de umidade. 85

Figura 7: Teores de proteínas presentes no substrato fermentado pelo *Penicillium viridicatum RFC3*. 85

Figura 8: Produção média da Exo-PG cultivada em erlenmeyers a 70% (■) e 80% (□) de umidade. 91

Figura 9: Produção média da Exo-PG cultivada em 91

embalagens de polipropileno a 70% (■) e 80% (□) de umidade.

Figura 10: Produção média da Exo-PG cultivada em erlenmeyers a 70% (▲) e 80% (△) de umidade. 97

Figura 11: Produção média da Exo-PG cultivada em embalagens de polipropileno a 70% (▲) e 80% (△) de umidade. 97

Figura 12: Produção média da Exo-PG cultivada em erlenmeyers a 70% (●) e 80% (○) de umidade. 102

Figura 13: Produção média da Exo-PG cultivada em embalagens de polipropileno a 70% (●) e 80% (○) de umidade. 103

Figura 14: Produção das enzimas despolimerizantes por *Penicillium viridicatum RFC3* no substrato a 80% de umidade.
A: Xilanase (□),Protease (◇) e CMCase (△).
B: Amilase (*),Pectina Esterase (+) 104

Figura 15: Separação das frações enzimáticas de EXO-PG em coluna de gel Sephadex G-50. Proteína (∗):
A: atividade da EXO-PG (■).
B: atividade da ENDO-PG (▲).
C: atividade da PL(●). 119

Figura 16: Efeito do pH sobre a atividade da fração correspondente da exo-PG (■) e PL (○) separada em Sephadex G-50. 120

Figura 17: Efeito do pH sobre a atividade da fração correspondente da endo-PG (△), fracionada em Sephadex G-50 121

Figura 18: Efeito da de temperatura sobre a atividade da exo-PG (■) e PL (○) fracionada em Sephadex G-50. 122

Figura 19: Efeito da temperatura sobre a atividade 122

da endo-PG (▲) fracionada em Sephadex G-50.

Figura 20: Estabilidade da exo-PG (■) e PL (○) frente à variações de pH. 123

Figura 21: Estabilidade da exo-PG (■) e PL (○) frente a variações de temperatura. 124

Figura 22: Ação das pectinases sob pectinas de diferentes graus de metoxilação. 125

Figura 23: Cromatogramas obtidos a partir da hidrólise da pectina utilizando extrato enzimático bruto e frações separadas obtidas da linhagem *P. viridicatum* RFC3. (E-XO = pectina hidrolisada pela exo-PG (fração 3); E-DO = pectina hdrolisada pela endo-PG (fração 2); PL = pectina hidrolisada pela pectina liase (fração 1); EB = pectina hidrolisada pela enzima bruta; G = Padrão de Ac. Galacturônico; DG= Padrão de Ac. Digalacturônico; TG= Padrão de Ac. Trigalacturônico; PG= Padrão de Ac. Poligalacturônico. 127

Figura 24: Estrutura química da Ocratoxina A (OTA), (Hussein e Brasel, 2001). 134

Figura 25: Fluxograma do processo de extração de sucos. 142

B. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Análise dos substratos utilizados nos ensaios fermentativos semi-sólidos. 50

Tabela 2: Análise de variância da atividade da Exo-Poligalacturonase obtida nos ensaios fermentativos. 52

Tabela 3: Teste de Tukey para as médias de produção de Exo-PG resíduos agro-industriais utilizados nos ensaios fermentativos. 53

Tabela 4: Teste de Tukey para as médias dos tempos de cultivo para a produção de Exo-Poligalacturonase, nos ensaios fermentativos. 54

Tabela 5: Análise de variância da atividade da Pectina liase obtida nos ensaios fermentativos. 55

Tabela 6: Teste de Tukey para as médias de produção de PL nos resíduos agro-industriais utilizados nos ensaios fermentativos. 56

Tabela 7: Teste de Tukey para as médias das produções de Pectina liase em relação ao tempo de cultivo nos diferentes resíduos. 56

Tabela 8: Análise de variância da atividade da Exo-PG obtida pela combinação dos resíduos com o bagaço de cana. 58

Tabela 9: Teste de Tukey para as médias das atividades de Exo-PG obtidas pelo cultivo de *P.* viridicatum na mistura dos resíduos com bagaço de cana. 59

Tabela 10: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Exo-PG em relação ao tempo de cultivo nas misturas dos resíduos com bagaço de cana. 59

Tabela 11: Análise de variância da atividade da Pectina liase obtida pelo cultivo do fungo *Penicillium viridicatum RFC3* combinado com o bagaço de cana. 60

Tabela 12: Teste de Tukey para as médias de produção de PL, nos resíduos combinados com bagaço de cana. 62

Tabela 13: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da PL, em relação ao tempo de cultivo, para os resíduos combinados com o bagaço de cana. 62

Tabela 14: Análise físico-química do substrato utilizado na fermentação semi-sólida de *P. viridicatum RFC3.* 81

Tabela 15: Extração das pectinases utilizando diferentes solventes e tempos de agitação. 82

Tabela 16: Análise de variância da atividade da Exo-Poligalacturonase produzida em erlenmeyers. 87

Tabela 17: Teste de Tukey para as médias das Umidades utilizadas nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-Poligalacturonase. 87

Tabela 18: Teste de Tukey para as médias dos tempos de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-Poligalacturonase. 88

Tabela 19: Desdobramentos da Temperatura (T) dentro das Umidades (U) para a Exo-PG produzida 88

Tabela 20: Análise de variância da atividade da Exo-Poligalacturonase produzida em embalagens de polipropileno. 85

Tabela 21: Teste de Tukey para as médias das Umidades utilizadas nos ensaios 90

fermentativos para a produção de Exo-Poligalacturonase.

Tabela 22: Teste de Tukey para as médias dos tempos de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-Poligalacturonase. 90

Tabela 23: Análise de variância da atividade da Endo-Poligalacturonase produzida em erlenmeyers. 92

Tabela 24: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação à umidade do substrato. 93

Tabela 25: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação ao tempo de cultivo. 94

Tabela 26: Quadro de análise de variância da atividade da Endo-Poligalacturonase. 95

Tabela 27: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação à umidade do substrato. 96

Tabela 28: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação ao tempo de cultivo. 96

Tabela 29: Quadro de análise de variância da atividade da Pectina liase (PL) em erlenmeyers. 99

Tabela 30: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Pl em relação à umidade do substrato. 99

Tabela 31: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da PL em relação ao Tempo de cultivo. 99

Tabela 32: Análise de variância da atividade da Pectina liase (PL) produzida em embalagens de polipropileno. 101

Tabela 33: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Pl em relação à umidade do substrato. 101

Tabela 34: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da PL em relação ao Tempo de cultivo. 101

Tabela 35: Síntese do processo de purificação da PG (endo e exo) e PL em coluna Sephadex G-50 a partir da solução enzimática bruta obtida após 336 horas de cultivo em meio de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1). 118

Tabela 36: Efeito dos íons na atividade das pectinases obtidas a partir das frações coletadas em Sephadex G-50. 126

Tabela 37: Codificação dos dados para realização dos experimentos de extração de sucos. 141

Tabela 38: Atividade de enzimas despolimerizantes determinadas na solução enzimática bruta usada na extração de sucos 146

Tabela 39: Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de banana. 147

Tabela 40: Teste de Tukey para as médias da extração do suco de banana dentro dos tratamentos. 148

Tabela 41: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração. 149

Tabela 42: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das enzimas dentre os diferentes tratamentos. 149

Tabela 43: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a fração I da PL coletada. 150

Tabela 44: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a fração II da endo-PG coletada. 150

Tabela 45: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a fração III da exo-PG coletada. 150

Tabela 46: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das frações enzimáticas coletadas 151

Tabela 47: Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de maçã. 152

Tabela 48: Teste de Tukey para as médias da extração do suco de maçã dentro dos tratamentos. 153

Tabela 49: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração. 154

Tabela 50: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de maçã com o uso das enzimas dentre os diferentes tratamentos. 154

Tabela 51: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a fração I da PL coletada. 155

Tabela 52: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a fração II da endo-PG coletada. 155

Tabela 53: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a fração III da exo-PG coletada. 155

Tabela 54: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das frações enzimáticas 156

coletadas

Tabela 55: Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de cenoura. 156

Tabela 56: Teste de Tukey para as médias da extração do suco de cenoura dentro dos tratamentos. 157

Tabela 57: Análise de variância da extração do suco de cenoura utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração. 158

Tabela 58: Análise de variância da extração do suco de cenoura utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração. 159

Tabela 59. Níveis de Ocratoxina e Aflatoxina detectados no substrato estéril e fermentado pelo fungo *Penicillium viridicatum RFC3*. 160

191

Tabela 1A: Produção da Exo-poligalacturonase (U/mL) cultivada em sacos de polipropileno (S) e Erlenmeyers (E) hidratados a 70 e 80% de umidade por 336 horas. 192

Tabela 2A: Produção da Pectina liase (U/mL) cultivada em sacos de polipropileno (S) e Erlenmeyers (E) hidratados a 70 e 80% de umidade por 336 horas. 192

Tabela 3A: Produção da Endo-poligalacturonase (U/mL) cultivada em sacos de polipropileno (S) e Erlenmeyers (E) hidratados a 70 e 80% de umidade por 336 horas. 193

Tabela 1B: Síntese do processo de extração do suco de banana através do uso de pectinases. 194

Tabela 2B: Síntese do processo de extração do suco de maçã através do uso de pectinases. 195

Tabela 3B: Síntese do processo de extração do suco de cenoura através do uso de pectinases. 196

Tabela 4B: Síntese do processo de extração do suco de banana através do uso das frações de pectinases separadas em sephadex G-50 por 2 horas a 50°C. 197

Tabela 5B: Síntese do processo de extração do suco de maçã através do uso das frações de pectinases separadas em sephadex G-50 por 2 horas a 50°C. 198

SILVA, D. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum RFC3* através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas. 2003. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto - SP.

I- RESUMO

A aplicação de pectinases em processos industriais, como processamento de sucos de frutas e vegetais, produção de vinhos, extração de óleo de oliva, maceração de vegetais para a produção de pastas e purês, na produção de fibras têxteis a partir do linho, e na preservação da madeira, tem crescido consideravelmente, justificando o interesse pela produção comercial das mesmas. Como fonte destas e de outras enzimas, os microrganismos surgem como a melhor alternativa em função da grande diversidade de espécies, permitindo a obtenção de enzimas que podem ser utilizadas em variadas condições físico-químicas. A produção de pectinases microbianas pode ser induzida pela presença de substâncias pécticas no meio de cultivo, o que pode levar a um aumento considerável da produção. Por outro lado, identificação das frações enzimáticas presentes e a caracterização das mesmas, facilitam a sua aplicação nos processos industrias.

Em vista disso, o presente projeto teve por objetivos avaliar aspectos da produção de pectinases

pelo fungo *Penicillium viridicatum RFC3* através de fermentação em estado sólido utilizando como substrato, bagaços de cana-de-açúcar e de laranja, farelo de trigo, caca de manga e banana e polpa de maçã, assim como, selecionar o melhor substrato para dar continuidade ao estudo da produção de pectinases (poligalacturonases de ação endo e exo e pectina liases) em erlenmeyers e embalagens de polipropileno, sob umidades de 70 e 80%, durante 336 horas de cultivo. Foram ainda determinadas as produções das enzimas xilanase, celulase, amilase, pectina esterase e protease e de micotoxinas durante o processo fermentativo.

A partir da solução enzimática bruta, obtida nas melhores condições fermentativas foi feita a separação das frações de pectinases, através de filtração em Gel Sephadex G-50.

A produção de pectinases foi influenciada pelo tipo de substrato sólido usado sendo maior em meio composto por farelo de trigo.

Os resultados indicaram também que o Erlenmeyer mostrou-se o biorreator mais adequado para a produção das enzimas assim como, o meio de cultivo hidratado a 80% de umidade. As maiores produções das enzimas ocorreram entre 288 e 336 horas de cultivo.

Foi detectada na solução enzimática bruta a presença de outras enzimas despolimerizantes como xilanase, celulase, amilase, pectina esterase e protease em quantidades consideráveis.

O processo de filtração em gel Sephadex G-50 levou à separação de 3 picos de Exo-PG e 4 picos de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Endo-PG e PL. A atividade das enzimas presentes nessas frações mostraram-se dependentes de íons metálicos como magnésio, zinco, potássio e EDTA, além de apresentarem diferentes especificidades em relação a pectinas com diferentes graus de metoxilação.

A extração de suco de frutas, utilizando-se a solução enzimatica bruta mostrou um alto rendimento principalmente quando esta foi testada nas suas condições ótimas de pH e temperatura de atividade por períodos de 2 horas. Quando aplicadas isoladamente, as frações enzimáticas demonstram menor eficácia no favorecimento da extração do suco, quando comparadas com a solução enzimática bruta.

Os resultados com relação a presença de aflatoxina e ocratoxina foram bastante animadores indicando que, além de não haver produção significativa das mesmas durante o processo fermentativo, ainda houve uma redução em relação as quantidades já existentes no substrato não fermentado.

Palavras chave: *Penicillium*, fermentação semi-sólida, pectinases, erlenmeyers, embalagens de polipropileno, aplicação.

SILVA, D. Study of the pectinases production by *Penicillium viridicatum RFC3* through semi-solid fermentation on agricultural residues. 2003. 198 f. Dissertation (Master Degree in Food Science) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto - SP.

II - ABSTRACT

The application of pectinases in industrial processes, like fruit and vegetable juice processing, wine production, olive oil extraction, vegetable maceration for paste and purée production, textile fibers production from the linen and preservation of the wood, had considerable increase, justifying the interest of the commercial production of it. As a source of pectinase and others enzymes, microorganisms appear to be the best choice as species diversity, allowing the obtainment of enzymes that could be used in many physical and chemical conditions. The production of pectinases by microorganisms can be induced by the presence of pectin substances in culture medium leading to any considerable increase of the production. On the other hand, identification of enzymatic fractions and the characterization of it facilitate its application in their industrial processes.

Therefore, the purpose of this project is to analyse the asppects of the pectinases production by the fungi *Penicillium viridicatum RFC3* with a solid state fermentation using sugar cane and orange bagasse, wheat bran, mango and

banana peel as a substract, as well as elect the best substract to continue the study of the pectinases production (polygalacturonases endo and exo action, and pectin lyases) in erlenmeyers flasks and polipropilene bag, with 70 and 80% of moisture, during 336 hours of cultivation. It was also determinated the production of some other enzymes like xylanases, celulases, amylases and pectin esterases and proteases and micotoxins during fermentation processes.

From the crude enzymatic solution, obtained in the best fermentation condition, pectinases fractions was separated by filtration in gel Sephadex G-50.

The production of pectinases was influenced by the type of the solid substrate used, being higher in medium composed with wheat bran.

The results also indicated that Erlenmeyer flasks were the best bioreactors for the production of the studied enzymes and the culture medium with 80% of moisture. The best production of enzymes occurred between 288 and 336 hours of cultivation.

It was detected in the crude enzymatic solution the presence of others depolymerizing enzymes as xilanase, celulase, amylase, pectin esterase and protease in considerable quantities.

The filtration processes by Gel Sephadex G-50 lead to a separation into 3 peaks of Exo-PG and 4 peaks of Endo-PG and PL. The activities of the enzymes present in these fractions showed to be dependent of metallic ions with Zn^{+2}, Mg^{+2}, K^{+1} and EDTA, and also showing different specificities in

relation of pectinases with different levels of metoxilation.

The extraction of fruit juice using the crude enzymatic solution showed high yield, mainly in optimum conditions of pH and temperatures of activities during a period of two hours. When the isolated fraction was applied, it demonstrated less efficiency in juice extraction, when compared with the crude enzymatic solution.

The results that considerate the presence of ochratoxin and aflatoxin was satisfactory showing that, even with no significative production during fermentative processes, it still had reduction in relation of the quantities already existents in the sterile substrate.

unesp

III - INTRODUÇÃO

As pectinas são complexos de polissacarídeos formados por cadeias de ácido galacturônico unidos por ligações do tipo $\alpha(1-4)$, às quais ainda podem aparecer ligadas a outros açúcares como ramnose, arabinose, galactose e xilose (KASHIAP *et al.*, 2001). Muitos microrganismos têm a capacidade de degradar essa estrutura através da síntese de enzimas extracelulares como as Poligalacturonases de atividade endo e exo (Endo-PG e Exo-PG) e a pectina liase (PL).

A produção de pectinases, visando a aplicação industrial, tem sido feita a partir de microrganismos, uma vez que a grande diversidade de espécies e linhagens existentes permite o isolamento de enzimas com características diversificadas, as quais podem ser aplicadas nas mais variadas condições físico-químicas.

Para a obtenção de uma enzima deve-se levar em conta o custo, o rendimento e o tempo requerido. Nesse contexto, as enzimas microbianas apresentam vantagens pois são facilmente produzidas em larga escala, em função do rápido crescimento dos microrganismos, e em meios facilmente disponíveis e de baixo custo, haja vista a grande diversidade de substratos utilizáveis por estes microrganismos, incluindo resíduos agrícolas e industriais. Ainda, a facilidade de obtenção de linhagens altamente produtoras de enzimas específicas contribui significativamente para a viabilidade desse bioprocesso (PRIEST, 1984).

Para a produção dessas enzimas vem sendo retomado, nestas últimas décadas, o emprego da fermentação semi-

sólida, na qual o microrganismo é inoculado em um meio sólido e mantido a uma baixa quantidade de água visível. Os substratos estudados variam desde resíduos e sub-produtos agrícolas como casca de frutas, casca de café, entre outros, até resíduos agro-industriais como bagaços de cana-de-açúcar, laranja e polpa de maçã (SILVA *et al.*, 2002).

As pectinases fúngicas representam aproximadamente 3% do total das enzimas no mercado, sendo sua produção industrial feita a partir de *Aspergillus niger* e *Fusarium sp.* Essas enzimas vêm sendo empregadas industrialmente na clarificação de sucos de frutas e vegetais, diminuindo a viscosidade e a turbidez, promovendo um aumento do rendimento durante o processamento (PILNIK e VORAGEN, 1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

IV - OJETIVOS

IV.1. Gerais

-Estudar a produção de poligalacturonases (endo e exo) e pectina liase por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agrícolas e agro-industriais como substratos e definir os melhores biorreatores, umidade do substrato e tempo de fermentação para a produção das enzimas.

IV.2. Específicos

-Estudar a produção de pectinases em fermentação em estado sólido utilizando bagaços de cana-de-açúcar e laranja, farelo de trigo, casca de banana e manga, tegumento do grão de milho e polpa de maçã visando a escolha do melhor substrato para a obtenção das enzimas.

-Estudar a produção de pectinases em erlenmeyer e em embalagem de polipropileno, avaliando o efeito da umidade inicial do substrato e o tempo de cultivo.

-Identificar outras enzimas (pectinesterase, hemicelulases, celulases, xilanases e amilases) produzidas, ao final do processo fermentativo.

- Separar as enzimas produzidas através de processos cromatográficos e caracterizá-las.

- Avaliar a ação das enzimas brutas e das frações separadas, na extração de sucos, considerando-se as condições de pH, temperatura e tempo de extração.

- Avaliar os níveis de ocratoxina e aflatoxina presentes no material fermentado.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

V - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

O processo de fermentação pode ser definido como a transformação de um determinado substrato em um determinado produto pela ação de microrganismos e pode ser dividido geralmente em submerso e semi-sólido (MITCHELL *et al.*, 2000). A maior diferença entre estes dois bioprocessos é a quantidade de água livre no substrato. A fermentação semi-sólida (FSS) envolve o crescimento de microrganismos em substratos sólidos em ausência (ou próxima dela) de água visível entre as partículas do substrato. A água presente no meio geralmente está fortemente adsorvida às partículas do substrato. Na fermentação submersa (FSM), a atividade de água é muito alta e o meio, quando diluído, pode alcançar um grande volume, quando comparado ao meio semi-sólido. Em FSM a água chega a constituir cerca de 90-99% da massa total do material a ser fermentado (MITCHELL *et al.*, 2000).

Segundo Pandey *et al.* (2000b) e Mitchell *et al.* (1992), a fermentação semi-sólida pode ser definida como o tipo de fermentação que ocorre perto ou próximo da ausência de água livre e pode ter como fontes de carbono e energia apenas o substrato (fermentação em substrato sólido) ou o substrato associado a um outro material como suporte sólido inerte (fermentação em estado sólido).

O processo de fermentação semi-sólida (FSS) envolve vários fatores além da atividade de água (a_w) do substrato, que pode estar abaixo de 0,99. A transferência de calor é restrita, principalmente quando envolve uma fermentação em grande escala e, neste caso, a evaporação

se torna um fator preponderante para o esfriamento do meio. Os substratos são mais concentrados em FSS do que em fermentação submersa (FSM) e muitas vezes esses substratos precisam de um pré-tratamento para que o microrganismo possa acessar os nutrientes do meio.

Dentre outros fatores que afetam o processo fermentativo estão o crescimento microbiano e sua atividade sobre o substrato em particular. A maneira com que o microrganismo degrada a partícula, o "pool" de enzimas necessário a essa degradação e o tamanho da partícula, devem ser considerados.

1.1. Fatores que afetam crescimento microbiano e produção de enzimas em FSS.

O crescimento de fungos em substratos sólidos é único para cada substrato, pois este depende da penetração das hifas no substrato, assim como, na própria composição do mesmo.

Varzakas *et al.* (1997) observaram um crescimento de 2mm das hifas em 40h de cultivo em grãos de soja enquanto que Sangsurasak *et al.* (1996) e Gutiérrez-Rojas *et al* (1997) observaram 2 tipos de crescimento micelial durante a fase vegetativa. Num primeiro, parte do micélio geralmente cresce na superfície do substrato enquanto outro cresce penetrando no substrato de forma a colonizar totalmente fibras e grãos.

Devido às atividades metabólicas dos microrganismos e, dependendo da espessura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo. Como a temperatura afeta a germinação dos esporos, o crescimento, a esporulação dos microrganismos,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

o metabolismo e a formação do produto, o calor produzido deverá ser dissipado para evitar danos à fermentação. Essa dissipação de calor pode ser feita através da circulação forçada de ar ou de outro sistema que impeça o aquecimento (LONSANE, 1985). A temperatura mostra-se bastante variável num processo de FSS, como no caso do cultivo de *A. oryzae* durante o cultivo em arroz koji no qual os conidiosporos, primeiro espalham-se pelo meio e a temperatura é mantida constante a 30-32°C, a qual é ótima para a germinação. Após 1 dia de fermentação, a temperatura se eleva gradualmente até 35°C. Em seguida, o meio é amassado, misturado e espalhado de forma que tenha um crescimento uniforme sobre a "cama" e, após 2 dias de cultivo, a temperatura máxima do koji chega a 40°C (SATO e SUDO, 1999).

A a_w é outro fator extremamente importante num bioprocesso, pois geralmente, o crescimento microbiano e a atividade de enzimas são inibidos num menor grau, quando a umidade do meio é diminuída. Usualmente, essa diminuição do a_w aumenta a fase lag de crescimento de um microrganismo, até tal ponto que este pára de crescer resultando em menor quantidade de biomassa. Em geral, bactérias requerem um valor de a_w alto. Já os fungos competem com mais sucesso em a_w mais baixos (MITCHELL e LONSANE, 1992).

Outro fator a ser considerado é a tensão de O_2 e CO_2 no meio. Sato e Sudo (1999), reportam que uma taxa de oxigênio menor que 0,2% não afeta o crescimento de *Aspergillus oryzae* em grãos de arroz cozido, todavia, a fase lag de germinação é aumentada pela baixa concentração de oxigênio, enquanto que uma alta taxa de CO_2 (>10%) inibiu o crescimento. O crescimento micelial restringe-se

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ao uso do oxigênio difuso no substrato e esse O_2 tem um limite de difusão para o crescimento (MITCHELL *et al.*, 1990). Villegas *et al.* (1993) reportam que a produção de protease ácida por *A. niger* é acelerada numa concentração de 4% de CO_2.

Ainda, o controle do pH durante a FSS, embora seja um dos pontos mais críticos, dificilmente é conseguido devido à heterogeneidade e a consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito da variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato, como a amônia ou uréia, cuja hidrólise libera amônia que rapidamente alcaliniza o meio de cultivo (LONSANE, 1985).

O tamanho da partícula é outro fator a ser considerado. Partículas pequenas geralmente constituem uma maior superfície para o ataque microbiano, facilitando a penetração das hifas e liberação de exo-enzimas que proporcionam a degradação do substrato. Porém, se o tamanho da partícula for muito pequeno, estas podem provocar a compactação do meio pela diminuição dos espaços inter-partículas e interferir na aeração do meio e respiração microbiana, podendo causar um aquecimento e resfriamento desbalanceados. Por outro lado, uma superfície muito grande pode melhorar a aeração e respiração, mas dificultar o ataque do microrganismo à partícula (SARRETTE *et al.*, 1992 e KAR *et al.*, *1998*).

Os microrganismos podem produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares em FSS como pectinases, celulases, amilases, proteases entre outras. A produção da enzima é regulada por mecanismos fisiológicos

como repressão catabólica pela glicose tanto em FSM como em FSS (SILVA *et al.*, 2002 e SATO e SUDO, 1999).

Geralmente o substrato sólido é naturalmente mais concentrado em relação a carboidratos e proteínas do que quando comparado a um substrato líquido. Em FSM a água constitui cerca de 90-99% da massa total enquanto que na FSS essa massa varia de 10-85%. Como essa concentração de substratos solúveis e produtos podem alcançar altos níveis, estes potencialmente aumentam os efeitos inibidores e repressivos no microrganismo. Logo, a FSS necessita de um tempo de cultivo muito maior quando comparado a FSM principalmente no que se refere à produção de proteínas por fungos lignocelulósicos (MITCHELL e LONSANE, 1992).

1.2. Tipos de substratos utilizados na FSS

De acordo com a fonte de carbono utilizada pelos microrganismos, os substratos podem ser divididos em três grupos: aqueles que contém amido, aqueles que contêm celulose e lignocelulose e aqueles que contêm açúcares solúveis como fonte de carbono. Os substratos amiláceos que podem ser utilizados em FSS incluem arroz, mandioca, farelo de trigo, farelo de arroz, sementes de trigo-mouro, milho, resíduos de batata doce e resíduos de banana. Um pré-tratamento do grão de cereal como moagem, raspagem ou corte faz com que o tamanho das partículas dos grãos sejam reduzidos a milímetros de diâmetro, evitando a compactação da partícula, comum em materiais constituídos por partículas pulverizadas (MITCHELL e LONSANE, 1992).

O amido em sua forma natural, com suas longas cadeias de amilose e amilopectina, dificilmente é degradado por

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

microrganismos a monômeros de açúcar para serem prontamente assimilados. Por isso, ao ferver ou cozinhar a vapor, o amido se gelatiniza transformando-se em uma forma mais solúvel, passível de ser degradado e assimilado pelo microrganismo (MITCHELL *et al.*, 2000).

Os substratos amiláceos podem ser prejudicados pelo aumento da viscosidade do substrato, que pode causar uma aglomeração das partículas durante os processos de FSS, especialmente se o substrato for misturado a outros materiais. Essa compactação exclui todo o ar do meio e prejudica o crescimento microbiano (MITCHELL *et al.*, 2000).

Vários processos diferentes têm sido investigados visando a utilização de materiais lignocelulósicos em FSS. Substratos sólidos como palha de trigo, palha de milho e arroz, polpa de madeira têm sido testados (MITCHELL *et al.*, 1992).

A hidrólise da celulose requer a ação sinergística de várias celulases. Em muitas situações, o material celulósico empregado como substrato é parcialmente degradado, durante o processo fermentativo, resultando em um composto de fibras mais acessíveis e enriquecido em proteínas microbianas o que o torna um excelente componente de ração animal (MITCHELL *et al.*, 1992).

Substratos lignocelulósicos podem ser submetidos a tratamentos prévios como cozimento a vapor ou tratamentos com ácidos e álcalis para quebrar a estrutura da celulose e lignina a tamanhos de 1-2mm, o que aumenta a superfície para o ataque do microrganismo. A lignina normalmente é incapaz de servir como fonte de carbono e energia sem pré-tratamento, a não ser que microrganismos ligninolíticos atuem na sua degradação (MITCHELL *et al.*, 2000).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Os substratos sólidos contendo açúcares solúveis incluem a polpa de uva, sorgo doce, beterraba doce, restos de abacaxi, polpa de café, casca de manga e banana, entre outros. Entretanto, tem sido demonstrado que esses materiais, por possuírem altos teores de açúcares redutores prontamente assimiláveis pelo microrganismo, promovem a repressão catabólica de enzimas despolimerizantes, além de suas partículas altamente higroscópicas, compactarem fortemente reduzindo a troca de calor e gases (SILVA, *et al.*, 2002). Uma estratégia para contornar esse problema é misturar esses substratos com materiais sólidos inertes como bagaço de cana ou linho (MITCHELL *et al.*, 2000, SILVA *et al.*, 2002, MARTINS *et al.*,2002).

Ooijkaas *et al.* (2000) utilizaram meios de suportes inertes associados a meios de cultivo definidos e observaram que estes suportes inertes são fatores cruciais para o sucesso da FSS. O uso de substratos inertes sintéticos é vantajoso na FSS em relação ao substrato natural, pois permite reprodutibilidade muito maior, facilitando o controle dos processos e o monitoramento das variáveis a serem estudadas, como pH, a_w, temperatura, CO_2 e O_2. Comercialmente, esses substratos inertes dependem de fatores como, custos do meio, do fermentador, do processo de "downstream" e valor do produto para serem aplicados.

Como substratos inertes naturais e sintéticos pode-se usar vermiculite, perlite, grânulos de barro, amberlite, polietileno e espuma de poliuretano, além de bagaço de cana-de-açúcar, de milho, casca de arroz, etc. Estes últimos só são adequados a processos cujos microrganismos tem pouca ou nenhuma atividade celulolítica ou lignolítica (OOIJKAAS *et al.*, 2000). Sistemas com suporte inerte podem

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ser aplicados para a produção de vários produtos como esporos fúngicos, na formulação de bioinseticidas; produção de ácidos giberélico, cítrico, L-glutâmico; antibióticos, como penicilina; e enzimas como lipases, nucleases, amilases, pectinases, celulases, etc (OOIJKAAS *et al.*, 2000).

Soares *et al.* (2000) produziram aromas de frutas pela fermentação semi-sólida de casca de café suplementada com diferentes concentrações de glicose, produzindo variadas intensidades de aromas de frutas como abacaxi e banana. Quando suplementadas com solução salina, óleo de soja ou leucina, foi obtido um aroma de banana.

Vandenberghe *et al.* (2000) utilizaram substratos como bagaço de mandioca, casca de café e bagaço de cana na produção de ácido cítrico por FSS.

Pandey *et al.* (2000b) discutem a importância do aproveitamento do resíduo de mandioca (30-50% amido) nos processos biotecnológicos como produção de enzimas, ácidos orgânicos, alimentos e cogumelos, por FSS. Esse resíduo de mandioca é facilmente degradado por microrganismos sem tratamento prévio. Pandey *et al.* (2000a) destacam também, a importância da casca e polpa de café nos processos biotecnológicos. Por apresentar compostos como cafeína, taninos, derivados fenólicos, catequinas, ácidos isoclorogênicos dentre outros, esse substrato rico, é utilizado nos processos fermentativos na produção de enzimas, aromas, enriquecimento protéico, produção de cogumelos, fertilizante, alimento para gado e peixes, biogás, e pela hidrólise da casca para a obtenção de xilose, arabinose, frutose, glicose e maltose.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Substratos como torta de óleo de oliva e bagaço de cana-de-açúcar podem ser utilizados em FSS na produção de lipases em colunas de Raimbault (CORDOVA *et al.*, 1998).

1.3. Vantagens e desvantagens da FSS

Conforme discutido anteriormente, os meios para a fermentação semi-sólida são geralmente muito simples constituindo-se de resíduo da indústria, agricultura e outras atividades humanas, os quais, na maioria das vezes, contêm todos os nutrientes necessários ao crescimento microbiano, e não necessitam de um pré-tratamento (MITCHELL e LONSANE, 1992).

A baixa atividade de água, característica desse processo, pode significar um fator de inibição para possíveis contaminantes, especialmente bactérias e leveduras. Essa baixa a_w ainda pode reverter em características diferentes dos produtos obtidos como, por exemplo, a glucosidase produzida por *Aspergillus phoencis* em FSS é mais termotolerante que aquela obtida em FSM (DESCHAMPS e HUET, 1984).

A aeração forçada é mais fácil de ser usada em FSS devido aos espaços interpartícula o que facilitam as trocas gasosas entre as superfícies, porém, esse tipo de aeração pode criar caminhos preferenciais, dificultando a dispersão homogênea do oxigênio no meio (BAJRACHARYA e MUDGETT, 1980).

O uso de esporos como inóculo, facilita uma dispersão uniforme no meio sem que para isto sejam necessários grandes tanques de produção de sementes (esporos) (MITCHELL e LONSANE, 1992).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Por outro lado, a FSS apresenta algumas desvantagens em relação a FSM. A primeira delas é que geralmente se restringe ao uso de fungos filamentosos, em função da baixa atividade de água (MITCHELL e LONSANE, 1992).

A produção de metabólitos indesejáveis causados pelo aquecimento do substrato, pode se tornar um grande problema durante a fase de crescimento do microrganismo, especialmente quando o processo se dá em larga escala (TREVELYAN, 1974).

Substratos sólidos naturais são um problema no que se referem à reprodutibilidade e monitoramento do processo como a manutenção do pH, concentração e conteúdo do substrato.

A avaliação da biomassa produzida é um parâmetro fundamental para a caracterização do crescimento microbiano. Porém, é quase impossível sua medição diretamente em FSS envolvendo fungos filamentosos visto que as hifas penetram na partícula (MOO-YOUNG *et al.*, 1983).

A transferência de massa é um processo que pode ocorrer nas fases sólida, líquida e gasosa em FSS. Na fase gasosa, o oxigênio pode ser transferido para o local de atividade microbiana enquanto o CO_2 ou outro gás inibidor da atividade, é removido. Nas fases sólida e aquosa, os nutrientes dissolvidos no meio fazem com que as enzimas produzidas migrem para as partículas sólidas e os produtos formados são levados para longe do local da reação. Porém, a limitação do processo de difusão intrapartícula, devido a uma correlação de fatores como tamanho da partícula, porosidade e fluxo dos gases, podem ser um fator limitante ao crescimento microbiano, enquanto que em FSM esta é

facilitada pela agitação do meio líquido (MOO-YOUNG *et al.*, 1983).

Outro grande problema da FSS relaciona-se com a modelagem matemática dos processos que os tornam pobremente caracterizados devido a trabalhos qualitativos ou de ensaios empíricos e de uma dificuldade quanto à quantificação de parâmetros como o crescimento microbiano (MOO-YOUNG *et al.*, 1983).

Os cultivos freqüentemente são longos e o crescimento é baixo quando comparado à conversão do substrato, porém, a produtividade volumétrica pode ser similar ou maior que em FSM (MITCHELL e LONSANE, 1992).

1.4. Reatores utilizados em FSS

A escolha de um fermentador deve ser feita em função do objetivo da fermentação. Fatores como a análise econômica dos custos operacionais, do monitoramento, dos processos de carga, recarga e manutenção devem ser previamente estudados. Num processo de maior escala deve-se verificar se as condições dos processos realizados na bancada poderão ser reproduzidas em larga escala (RIZZATTO, 1999).

Vários tipos e modelos de reatores têm sido propostos em estudos de bancada ou em escala industrial. A seguir são descritos alguns tipos mais comuns.

a) Reatores de vidro: são os primeiros e mais comumente utilizados em laboratório. Os Erlenmeyers são utilizados pela facilidade de manuseio durante as pesquisas. Porém, quando se fala em ampliação do processo esses frascos deixam a desejar devido a problemas de aeração, troca de calor, umidade, etc. Muitos trabalhos de

unesp

pesquisa em bancada são realizados utilizando esses frascos visando principalmente a produção de enzimas por FSS.

Maiorano (1990) realizou estudos em erlenmeyers de 250 mL para a produção de pectinases por *Aspergillus*, tendo como substrato o farelo de trigo e Silva *et al.* (2002) também utilizaram o farelo de trigo no cultivo de *Penicillium viridicatum RFC3*.

b) **Embalagens plásticas:** geralmente estas embalagens são compostas de polipropileno que suporta altas temperaturas de esterilização e são permeáveis ao oxigênio e ao gás carbônico. São de baixo custo e fácil manuseio, permitindo uma boa homogenização do material e reduzindo as perdas de amostras principalmente por quebra de frascos (Costa, 1996)

Hennies (1996) e Rizzato (1999) estudaram a produção de pectinases por *Penicillium italicum* através de FSS de bagaço de laranja, industrialmente processado, em embalagens de polipropileno, concluindo que aquele fungo foi capaz de produzir grandes quantidades de pectinases no sistema.

c) **Bandejas:** são fermentadores de maior custo, pelo fato de necessitarem de uma grande área operacional e do substrato não poder ser esterilizado no fermentador. Apesar disso, são os tipos mais simples e as bandejas podem ser metálicas, de plástico ou de madeira. As bandejas devem ser perfuradas para que haja aeração através da superfície inferior do meio de cultivo. Essas bandejas são colocadas umas sobre as outras e arranjadas de modo a manter uma certa distância entre si (PANDEY, 1991).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

d) Tanques circulares: tipo de fermentador que mantém a cultura estática durante o processo. São usados em nível industrial como por exemplo, o produtor de koji automático estacionário que consiste de dois tanques rotatórios de 7m de diâmetro dotados de um misturador helicoidal para homogenização inicial do substrato. Dentro de uma câmara de condições controladas, podem ser processados cerca de 2 a 3 toneladas de meio de cultura. Os processos de esterilização, inóculo e retirada do produto são feitos automaticamente (TOYAMA, 1976).

e) Tubular Horizontal: consiste de um equipamento onde o crescimento microbiano é considerado melhor e mais uniforme do que nos fermentadores de bandejas (PANDEY, 1991). Porém, seu custo elevado para o volume de material produzido e dificuldades de ampliação de escala do processo e agitação (impedindo integridade do micélio) tornam-no inviável em larga escala. Nesse sistema o substrato é esterilizado e resfriado diretamente no tambor e sua agitação é realizada pela própria rotação do tambor ou por um agitador central. A aeração é realizada pela passagem de ar esterilizado e umidificado através do reator, para também se controlar a temperatura interna (THIEMANN, 1985).

Berovic e Ostroversnik (1997) utilizaram o processo de FSS em biorreatores de tambor horizontal e com rotação para a produção de PG e pectina esterase. Utilizou-se polpa de maçã como substrato. O crescimento e penetração total das hifas no material ocorreram em 36h de cultivo. A melhor atividade das enzimas foi a 35°C, porém, a PE foi inibida a baixas temperaturas (22-30°C).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

f) Tubular Vertical: também denominado de fermentador tipo coluna, tem sido utilizado em pesquisas quando se deseja obter o controle do processo. Esses tubos são constituídos de plástico ou vidro, dispostos verticalmente, com um leito fixo de substrato e tampas de ambos os lados. Esses fermentadores podem ser encamisados para o controle da temperatura através da circulação de água. Esses fermentadores são os que mais se adaptam ao aumento de escala e ao controle de processos (SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1992).

2. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM FSS

Durante o processo fermentativo, além do produto visado, vários outros metabólitos, enzimas e toxinas são produzidos. Muitas vezes, a presença dessas substâncias é indesejável. Inúmeros trabalhos têm relatado a presença de toxinas em grãos e cereais armazenados, leite e queijos (VISCONTI *et al*, 2001; FRISVAD, 1983; JANARDHANA *et al*, 1999; BRESLER *et al*, 1995; HUSSEIN e BRASEL, 2001 e D´MELLO, 1997).

As espécies de fungos filamentosos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários como Brevianamidinas A e B (cuja função é desconhecida), óleos, como Xantoviridicatina, pigmentos como Viomelina, Xantomegnina, Rubrosulfina e Vioxantina (POHLAND, 1977) e micotoxinas, como ocratoxinas, aflatoxinas, patulinas, e outras, que podem ser associados a uma grande variedade de efeitos adversos em animais e humanos. Esses compostos ocorrem no micélio desses microrganismos ou podem estar presentes nos esporos e geralmente são produzidas depois da fase de crescimento logarítimico (D'MELLO, 1997).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

A ocorrência natural de metabólitos secundários, como as micotoxinas em espécies de *Fusarium sp*, está geralmente associada ao crescimento desse microrganismo em cereais e grãos armazenados a baixas temperaturas (SCOTT, 1989).

A produção de micotoxinas é associada a milho contaminado por espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* (CAMPBELL e WHITE, 1995), a grãos armazenados de cevada, centeio, arroz e trigo deteriorados por *Penicillium sp.* (L'VOVA *et al.*, 1993; MILLS *et al.*, 1995), queijo espanhol e queijo azul contaminados por *Penicillium sp.* (ácido micofenólico), e *Aspergillus sp.* (aflatoxina M1). Tem sido detectada também em queijos, a roquefortina, produzida por *P. roqueforti* como um mecanismo de defesa contra a infestação de outros organismos exógenos (LOPEZ-DIAZ *et al.*, 1996). A produção destas toxinas durante o crescimento de fungos está relacionada com o tempo de armazenamento, temperatura, umidade e extensão da infecção (SCOTT, 1989).

A infestação de *F. moniliforme* em cultivares de milho e a produção de Aflatoxina B1 estão relacionadas com a atividade de água, temperatura, relação O_2/CO_2, etc (D'MELLO *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1998) assim como, com a capacidade do fungo em produzir toxina (FARRAR e DAVIS, 1991).

Abramson *et al.* (1999), mostraram a produção de micotoxinas por espécies como *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor* e *Penicillium sp.* em cevada, armazenada em celeiros entre 15 e 19% de umidade, correlacionando ainda esta produção a uma série de fatores como temperatura, CO_2, O_2, quantidade de inóculo, germinação das sementes. As micotoxinas detectadas foram a ocratoxina A, citrinina e esterigmatocistina. A produção

destas micotoxinas por *Penicillium sp* foi maior a 19% de umidade e não foi produzida a 15%.

A produção de toxinas também é afetada por fatores químicos, como aditivos (sorbato de potássio, metil parabeno, propionato de sódio e bissulfito de sódio). Conforme descrito por Tong e Draughon (1985), que estudaram os efeitos desses aditivos alimentares na inibição da produção da Ocratoxina A (OTA) produzida por linhagens de *P. viridicatum e A. sulphureous, o* sorbato de potássio (0.134%) e o metil parabeno (0.067%) em pH 4.5 e 5.5, inibiram a produção de toxina, porém, os níveis utilizados excedem o permitido para o consumo humano. Plantas medicinais provenientes da Índia, como espécies de canela, rosa, açafrão, curcuma parecem inibir a produção de toxinas (AZIZ *et al.*, 1998).

A diminuição na produção de toxinas geralmente está relacionada com a diminuição do crescimento micelial. Porém, Badii e Moss (1988) reportam que a ação de fungicidas como fenopropimorfo, aumenta a produção de Aflatoxina dos tipos B1 e G1 por espécies de *Aspergillus parasiticus*. Misturas de tebuconazol e triadimenol, aplicadas em trigo, reduzem a incidência da ferrugem vermelha provocada por *Fusarium sp.*, porém, a aplicação de nivalenol estimula a produção de toxina (GAREIS e CEYNOWA, 1994).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

2.1. Degradação de micotoxinas e compostos secundários por microrganismos durante processos fermentativos

A grande resistência de ruminantes ao efeito das micotoxinas deve-se aos microrganismos (protozoários e bactérias) presentes no rumem, os quais são capazes de degradar esses compostos (WOGAN, 1966). Mertens (1979) relata como efeitos negativos da presença dessa toxina no rúmem, a redução na degradação da celulose, produção de ácidos graxos voláteis, produção de amônia e proteólise. Frisvad (1983) estudando o metabolismo de OTA em gado notou que esta era degradada a 4-hidroxi-OTA, e que os protozoários do rúmem hidrolisavam as cadeias peptídicas da OTA em uma reação catalisada pela carboxipeptidase A e pelo quimotripsinogênio, o que diminuía a quantidade de metabólitos tóxicos. Varga *et al.* (2000) verificaram que espécies de *Aspergillus* (*fumigatus, japonicus e niger*) foram capazes de degradar a Ocratoxina A em meio de extrato de levedura + 0,2µg/mL de OTA. A OTA foi completamente convertida em OTα (forma menos tóxica) em 7 dias; e a OTα foi eliminada pela ação da carboxipeptidase que converte facilmente a OTA em OTα e fenilalanina pelo ataque aos anéis de isocumarina. Porém a via metabólica que degrada a OTα não é conhecida.

Com bases nessas informações é possível inferir que, embora a presença de metabólitos indesejáveis possa ocorrer num processo de FSS, é possível o controle da produção dos mesmos, mediante a alteração de fatores físico-químicos, como umidade, pH e tempo de fermentação (BUDIARSO *et al.*, 1971). Ainda, deve ser considerado que os substratos de origem natural, como resíduos vegetais,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

podem vir para o processo já contaminados com tais metabólitos e, dessa forma, é importante que se conheça a capacidade do microrganismo, usado no processo, em degradá-los.

3. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem usadas pelos homens. Sua aplicação industrial foi observada inicialmente a partir de 1930 para produção de vinhos e sucos de frutas. Essas enzimas são responsáveis pela degradação de uma longa e complexa cadeia de moléculas chamada pectina que é um polissacarídeo estrutural presente na lamela média e na parede primária das plantas superiores. Atualmente, essas enzimas são parte integrante dos processos das indústrias de sucos e têxteis chegando a constituir um mercado que movimentou U$ 75 milhões de dólares em 1995, do total de U$ 1 bilhão comercializado. Até 2005 espera-se que o mercado de enzimas chegue a movimentar U$ 1.7 a 2 bilhões de dólares (KASHYAP *et al.*, 2001).

3.1. Estrutura da Pectina

Quimicamente às substâncias pécticas são complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, formados por cadeias de ácido galacturônico unidos entre si por ligações do tipo $\alpha(1\text{-}4)$. As cadeias de pectinas ainda podem aparecer ligadas a moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose (KASHYAP *et al.*, 2001).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Os grupamentos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar parcialmente esterificados por grupamentos metil ou estar parcial ou totalmente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônia. Os C2 ou C3 podem ainda aparecer acetilados. De acordo com a modificação na cadeia, as substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido péctico, acido pectínico e pectina (BE MILLER, 1986).

As Protopectinas são substâncias pécticas insolúveis em água e encontradas nos tecidos de plantas, em frutas verdes. A partir dessas substâncias, são produzidas as substâncias pécticas solúveis durante o amadurecimento das frutas. São pouco hidrolisáveis quando comparadas à pectina ou ácido péctico (KILARA, 1982).

Ácidos pécticos são galacturonanas que contêm quantidades desprezíveis de grupamentos metoxila enquanto que os ácidos pectínicos são galacturonanas que apresentam menos de 100% de metoxilação em suas cadeias (Fig. 1). Estes formam pectinatos que são geralmente sais ácidos ou parecem com ácidos pectínicos que têm a propriedade de formar gel com açúcar e ácido (se o conteúdo de grupos metil forem adequadamente baixos) ou com combinações de sais de cálcio (KILARA, 1982).

Pectina é um nome genérico para uma mistura variada de componentes cujo ácido péctico é o maior deles. Na sua forma natural a pectina localiza-se na parede celular vegetal interligando outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar a protopectina insolúvel (KILARA, 1982).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

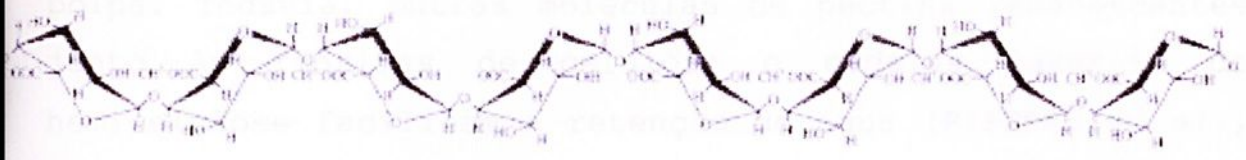


Figura 1: Estrutura da molécula de pectina parcialmente esterificada (SERRA *et al.*, 1992).

Num fruto verde, as cadeias de pectinas são unidas às microfibrilas de celulose para constituírem a parede celular vegetal. Tais pectinas são insolúveis e conseqüentemente, conferem rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, a estrutura da pectina é alterada pelas enzimas que ocorrem naturalmente nas frutas. Essas alterações envolvem a quebra da cadeia de pectina ou o ataque das suas subunidades, o que faz com que a pectina se torne mais solúvel e sua "amarração" da parede celular se afrouxe e o tecido da planta se torne mais mole (KASHYAP *et al.*, 2001).

A ação dessas enzimas foi estudada por Ketsa e Daengkanit (1999) que observaram a ação das enzimas (PG, pectina esterase, celulase e β-galactosidase) durante o amadurecimento de Durian (*Durio zibethinus*). À medida que o fruto amadurece, a firmeza deste diminui e a quantidade de água solúvel da pectina aumenta, coincidindo com o aumento da atividade da PG. As atividades da pectina esterase, β-galactosidase e celulase foram altas quando o fruto ainda estava verde, diminuindo à medida que este amadurecia.

As substâncias pécticas constituem cerca de 0,5-4% do peso fresco do material. Quando o tecido vegetal é macerado, a pectina é encontrada em sua fase líquida (forma solúvel) que causa o aumento da viscosidade da

polpa. Todavia, outras moléculas de pectina remanescentes junto às fibrilas de celulose e cadeias laterais de hemicelulose facilitam a retenção de água (PIFFERI *et al.*, 1989). A prensagem mecânica de frutas, ricas em pectina, rende um suco altamente viscoso que permanece junto à polpa na forma de uma massa geleificada. Isto dificulta a extração do suco pela prensagem ou outros métodos mecânicos. A adição de pectinases durante a prensagem quebra as moléculas de pectina e provoca um aumento no rendimento do suco extraído (KASHYAP *et al.*, 2001).

3.2. Enzimas Pectinolíticas

As enzimas pécticas são classificadas de acordo com a maneira que atacam a molécula de pectina. Basicamente, existem 2 grupos de enzimas pécticas: **desesterificantes** (pectina esterases) e enzimas **despolimerizantes** (hidrolases e liases) alem das **protopectinases** (fig. 2) (ALKORTA *et al.*, 1998).

a) Pectina esterases (PE) (EC 3.1.1.11) conhecidas também como pectina metil hidrolases, desesterificam os grupamentos metoxílicos da pectina formando o ácido péctico, liberando metanol e H^+, o que irá diminuir o pH do meio, servindo como critério para avaliação da atividade enzimática. Essa enzima é altamente específica para o metil éter do ácido poligalacturônico, enquanto que etil, propil e alil ésteres são atacados por algumas pectinaesterases, mas, usualmente, em taxas mais baixas. Essa enzima é inibida pelo ácido péctico, seu produto final de reação (PILNIK e RAMBOUTS, 1981).

b) Poligalacturonase (PG): A enzima **endo-PG** (EC 3.2.1.15) hidrolisa as ligações glicosídicas internas dos

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

poligalacturonatos de uma forma randômica, produzindo primeiramente uma série de oligogalacturonatos e terminando por liberar ácidos mono e digalacturônicos, dependendo do tempo de ação. Esta enzima pode ser obtida a partir de várias plantas e microrganismos, ocorrendo freqüentemente em múltiplas formas moleculares. A enzima **exo-PG** (EC 3.2.1.82) ocorre em plantas, fungos, bactérias e insetos; o produto final da hidrólise é o ácido galacturônico (Fig. 3). A ação da enzima exo-PG sobre o substrato ocorre a partir da extremidade não redutora da cadeia, sendo que uma unidade de galacturonato insaturado presente nesta posição pode bloquear a ação da enzima (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; FOGARTY e WARD, 1974).

c) Polimetilgalacturonato liase (PMGL): As **endo-PMGL** (EC 4.2.2.10) liases degradam polimetilgalacturonato de uma forma randômica, produzindo metil oligogalacturonatos insaturados. Pectinas altamente esterificadas são os melhores substratos desta enzima, sendo que os ácidos pécticos não são degradados pela mesma. A enzima endo-PMGL é produzida quase que exclusivamente por fungos, tendo sido demonstrado sua ocorrência em apenas duas linhagens de *Erwinia* e uma de *Pseudomonas*. A **exo-PMGL** ainda não foi descrita em nenhum estudo (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; WHITAKER, 1990).

d) Poligalacturonato liase (PGL): A enzima **endo-PGL** (EC 4.2.2.2) é produzida somente por microrganismos, basicamente por bactérias e alguns fungos. Ela atua sobre o poligalacturonato, produzindo oligalacturonatos insaturados, sendo os pectatos geralmente bons substratos para esta enzima. A atividade de endo-PGL diminui à medida que o comprimento da cadeia de oligogalacturonato diminui. As **exo-PGL** (EC 4.2.2.9) ocorrem só extracelularmente em

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

apenas algumas poucas bactérias, sendo o poligalacturonato seu substrato preferencial. A degradação por esta enzima produz normalmente digalacturonatos insaturados, a partir da extremidade redutora da cadeia do substrato. A degradação de poligalacturonatos e oligogalacturonatos a três unidades de ácido galacturônicos ocorre a uma velocidade constante, ao contrário do que acontece com a enzima endo-PGL (WHITAKER, 1990; MACMILLAN e SHEIMAN, 1974).

e) Protopectinases: atuam solubilizando a protopectina em presença de água, liberando e pectina altamente polimerizada da protopectina. Essas protopectinases têm alta especificidade por tri tetra e pentagalacturonatos, removendo-os a partir da extremidade redutora do açúcar.

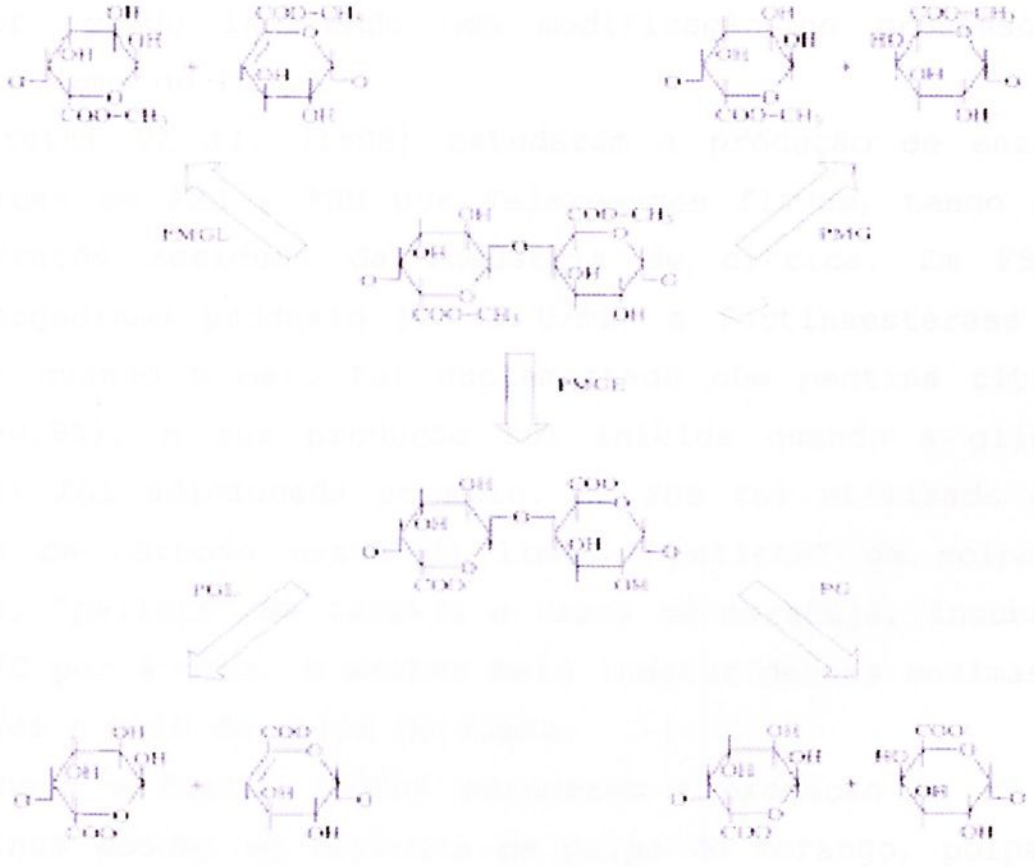


Figura 2: Ação das pectinases sobre as substâncias pécticas (SERRA *et al.*, 1992).

3.3. Substratos utilizados para a produção de pectinases

Hours *et al.* (1988) estudaram o uso da polpa de maçã como substrato para a FSS na produção de pectinases por *Aspergillus foetidus*. A síntese de pectinases por esse processo mostrou estar relacionada ao crescimento microbiano, conforme determinado através da medição dos níveis de glucosamina e ao consumo de açúcares como glicose e frutose ao longo do período fermentativo. Outro fator que influenciou a produção da enzima foi a limitação do consumo de O_2, devido à superfície do meio estar completamente coberta por uma camada micelial. Além disso, nesse período estudado, o processo de esporulação começou a ser notado indicando uma modificação no processo de metabolismo do fungo.

Crotti *et al.* (1999) estudaram a produção de enzimas pécticas em FSS e FSM por *Talaromyces flavus*, tendo como substratos resíduos da indústria de citrica. Em FSM o microrganismo produziu PG (5 U/mL) e Pectinaesterase (13 U/mL) quando o meio foi suplementado com pectina cítrica (0,5-0,8%), e sua produção foi inibida quando a glicose (0,8%) foi adicionada ao meio. Em FSS foi utilizado como fonte de carbono casca de limão, "pellets" da polpa de limão, "pellets" de laranja e casca de maracujá, incubados a 30°C por 6 dias. O melhor meio indutor dessas enzimas em FSS foi o meio da polpa do limão.

Zheng e Shetty (2000) estudaram a produção de PG por *Lentinus edodes* em resíduos de polpa de morango, polpa de maçã , polpa de cranberry. A atividade máxima da enzima após 40 dias de cultivo, nesses meios, foi de 29,4 U, 20,1

U, 14,0 U, respectivamente. Nesses experimentos, a atividade da PG aumentou com a adição de ácido poligalacturônico à polpa de maçã e ao cranberry, o mesmo não ocorrendo quando o meio foi polpa de morango. A produção máxima de PG em polpa morango ocorreu a 50°C e pH 5,0.

Beldman *et al.* (1984), utilizaram resíduos agro-industriais de cultivares de trigo, beterraba doce, arroz, cana-de-açúcar e batatas para produção de carboidratos fermentessíveis como açúcar de beterraba e amido de batata, para a produção de enzimas como pectinases, celulases e hemicelulases.

3.4. Aplicação de pectinases

As enzimas pécticas usadas na indústria de sucos e vinhos são obtidas de fungos, especialmente da espécie *Aspergillus niger*. As indústrias têm utilizado essas enzimas no processamento de sucos como maçã, pera, uva, ameixa, tomate, além dos sucos cítricos, para a remoção de resíduos de pectina e diversas outras impurezas (KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectinases são usadas também para aumentar o rendimento do suco durante a prensagem e para remover materiais em suspensão, fazendo com que o suco fique livre deste material no processamento. O suco de maçã ao ser prensado, não sofre filtração e nem clarificação inicial, o que deixa o suco com uma alta concentração de polpa. O suco escuro é centrifugado e as partículas grossas são removidas, pois não podem ser filtradas. A etapa final do tratamento corresponde à clarificação e ao tratamento

unesp

enzimático para remoção de pectina de modo a se obter um suco com coloração de âmbar (KASHYAP *et al.*, 2001).

Em sucos de frutos que ainda estão verdes pode surgir um problema de turbidez, pois o amido destes (15%) só pode ser degradado com o uso de amilases antes do uso de pectinases, no pH do próprio suco. Com o uso sinergístico destas enzimas previnem-se problemas de floculação e sedimentação que diminuem a qualidade final do produto (KASHYAP *et al.*, 2001).

O suco da laranja é obtido por meio de extratoras que cortam e prensam a laranja separando o suco de outros materiais como membrana dos gomos, albedo e casca o qual é direcionado a um tubo coador. Este suco é rico em material insolúvel oriundo das paredes das vesículas de sucos que é extraído juntamente com o suco. A retirada deste material, por meio de peneiramento (finisher), é importante para a qualidade final do suco de laranja. Este resíduo separado constitui uma polpa que ainda retém boa quantidade de suco o qual é recuperado em até três lavagens sucessivas. Após as lavagens, obtém-se um suco com cerca de 3° Brix (o suco primário tem cerca de 11° Brix), que é então levado a um tanque de reação enzimática e submetido à ação da pectinase visando a degradação da pectina. Neste processo, a enzima indicada é a endo-PG que baixa rapidamente a viscosidade do suco. Depois da despectinização o suco é submetido ao evaporador podendo ser concentrado até 65° Brix, sem problemas de geleificação ou encrustamento no evaporador. Este suco concentrado recebe o nome de "pulp wash", é rico em limonina e tem sabor amargo sendo assim de qualidade inferior. Esse suco corresponde a 5-6% do volume do suco de laranja processado na fábrica e é empregado como base cítrica nas indústrias de bebidas e

balas, tendo portanto valor comercial (CANTO e MENEZES, 1995).

Na indústria de suco de limão, a aplicação de misturas de pectinases é também importante para uma boa qualidade do suco clarificado. Neste caso a enzima deve ser ativa em pH baixo e uma mistura de endo-PG e celulase é recomendada para melhorar o rendimento e a clarificação do suco de limão (DA SILVA *et al.*, 1997).

O uso de pectinases na fabricação de Cidras azedas, doces ou amargas proporciona um produto final com alta qualidade. Tradicionalmente, a fermentação da maçã é muito lenta (algumas semanas a 3 meses) e alguns açúcares residuais podem permanecer dependendo do tipo de cidra produzida (seca, semidoce e azeda). Essas enzimas aplicadas durante a clarificação do suco de maçã aceleram a coagulação arrastando o pectato, proteínas e taninos do suco, que proporciona uma boa fermentação e produz uma cidra altamente aromática (KASHYAP *et al.*, 2001).

Um processo similar ocorre no processamento de suco de pêra, no qual as enzimas PG, PL, arabanase e arabinosidase são adicionadas após a maceração da polpa que é, após a aplicação das enzimas, misturada com acido cítrico e xarope de açúcar constituindo numa bebida do tipo "pronta para beber" (KASHYAP *et al.*, 2001).

Durante o processamento de vinhos um cuidado especial deve ser dado ao emprego de enzimas. Os componentes extraídos devem ser preservados ao longo da maturação, que pode levar anos. Os formulados enzimáticos devem levar em conta as peculiaridades do processamento do vinho. Assim, muitas reações específicas são requeridas para se obter uma boa maturação. No processamento de frutas, após desenvolverem sua ação, as enzimas são desnaturadas pela

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

pasteurização. Entretanto, no processo de produção do vinho este tratamento térmico não acontece, e por isto os preparados enzimáticos devem ser específicos para este processo. As preparações de pectinases são aplicadas à tecnologia de vinhos para melhorar tanto a clarificação do vinho branco quanto a cor no vinho tinto. Neste caso, é possível a formação de vinifenóis em concentração elevada no vinho final o que prejudica seu sabor. Isto se dá por causa da atividade da cinamoil esterase presente nas preparações enzimáticas. Esta enzima é capaz de produzir ácido cinâmico a partir de ésteres de ácido p-comariltartárico e cafeoil. O ácido cinâmico por sua vez é descarboxilado para vinifenóis pelas descarboxilases produzidas por *Saccharomyces cerevisae* durante a fermentação. Assim, a presença de enzimas indesejáveis numa formulação mista comercial deve ser evitada, porque pode levar à formação de compostos fenólicos que proporcionam um sabor desagradável no vinho.

Outro problema do vinho é a contaminação da uva com o fungo *Botrytis cinerea*, produtor de β-glicanas que obstruem os filtros, prejudicando a filtração e dificultando a clarificação. Preparados enzimáticos especiais contendo β-glicanase altamente específica para hidrólise das β-glicanas estão disponíveis comercialmente (DA SILVA *et al.*, 1997).

Em sucos de morango, framboesa e amora, a produção de um suco claro e concentrado requer o uso de pectinases para evitar a formação de géis de pectina, o que dificulta o processamento (clarificação, filtração e concentração). Estes sucos também podem conter a β-1,3-1,6 glucana, que forma uma goma e reduz a filtração e clarificação do suco,

também requerendo a aplicação de de β-glucanases (KASHYAP *et al.*, 2001).

O suco de manga é processado na forma de purê ou néctar e várias misturas com outras bebidas. Um típico néctar de manga contêm 20-30% de purê, pH de 3,5 e acidez titulável 0,2-0,3%. As enzimas como pectinases, celulases e hemicelulases são adicionadas para aumentar o rendimento na extração do suco, concentrá-lo e clarificá-lo (KASHYAP *et al.*, 2001).

O néctar de damasco possui uma concentração de 86% de células da fruta, 5% de resíduos celulares e 4% de outros agregados. O uso de enzimas pécticas em conjunto possibilita uma homogenização do néctar e estabilização deste, uma vez que a adição de enzimas em separado não é capaz de realizar (KASHYAP *et al.*, 2001).

A goiaba, produzida principalmente no Sul da África, Índia, Havaí e América do Sul pode ser processada na forma de néctar, sucos, xaropes, geléias. A polpa dessa fruta é tratada com enzimas como pectinesterase, arabanase, hemicelulase, tanase e celulase, as quais aumentam o rendimento na extração do suco. Esse grande número de enzimas empregadas é devido ao alto nível de resíduos celulares presentes na polpa, mesocarpo, parênquima e pericarpo do fruto (KASHYAP *et al.*, 2001).

No processamento do mamão papaia, o fruto é convertido numa polpa semilíquida que contém enzimas como pectina metil esterase (PME) e PG endógenas, mas o uso de enzimas ainda é necessário para a total despectinização do produto (KASHYAP *et al.*, 2001).

O abacaxi para ser processado e enlatado, necessita ser cortado em fatias ou cubos, e o suco claro e

concentrado pode ser usado para cobrir as fatias e cubos nas latas na forma de calda. O suco do abacaxi pode ser obtido como um subproduto drenado do maquinário que fatia o fruto ou pelos próprios frutos que são pequenos demais para serem cortados. O suco é despectinado (50°C, 20-30 minutos), pasteurizado e resfriado (KASHYAP *et al.*, 2001).

A banana é muito mais apreciada pelo seu sabor e aroma do que pelo suco produzido. O suco puro é feito para ser misturado a outros sucos devido à grande viscosidade da polpa da banana. Essa polpa para chegar num produto ideal e poder ser aplicada necessita passar por um branqueamento, para inibir a polifenol oxidase causadora do escurecimento enzimático, além de ser tratada com dióxido de enxofre (100ppm). O produto obtido possui um pH ótimo para a ação de pectinases que atuam ao mesmo tempo em que a banana é macerada, diminuindo a viscosidade da polpa. Após o processo, a polpa é prensada, clarificada ou centrifugada antes da concentração (KASHYAP *et al.*, 2001).

A aplicação de pectinases em produtos unicelulares consiste na transformação do tecido celular organizado em uma suspensão de células intactas através da quebra da lamela média do tecido vegetal. Essa suspensão é a base para a fabricação de polpas para sucos, néctares, comida de bebê, e ingredientes para produtos de uso diário como pudins e iogurtes. Os preparados enzimáticos utilizados nesses processos devem conter celulases e hemicelulases acrescidas de pectinases (KASHYAP *et al.*, 2001).

Outra aplicação dessas enzimas consiste na obtenção de protoplastos em experimentos de manipulação genética e estudos citogenéticos. O processo ocorre pela incubação de enzimas comerciais com o tecido da planta macerado. Esses

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

tecidos são convertidos em protoplastos pelo tratamento com pectinases e celulases (TAKEBE *et al.*, 1968).

Pectinases podem ser aplicadas também na separação da polpa e da semente em grãos de café. Essas enzimas removem a mucilagem e a polpa que cobrem o grão de café, reduzindo o tempo de fermentação do grão que, de 40-80, horas passa a ser de 20 horas, aproximadamente (AMORIM e AMORIM, 1977).

A extração de óleos como canola, girassol, palma, e oliva, geralmente ocorre pela adição de solventes orgânicos como o hexano, que é potencialmente carcinogênico. A aplicação de enzimas que degradem a parede celular em uma fase aquosa ocorre durante a prensagem do material e o óleo obtido é separado posteriormente. A vantagem dessa técnica é que além do aumento do rendimento do produto, o uso de enzimas aumenta a quantidade de polifenois e vitamina E, auxiliando na estabilidade do produto final (WEST, 1996).

unesp

VI - CAPITULO I: PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Penicillium viridicatum* RFC3 ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia das fermentações favoreceu-se muito dos avanços no aproveitamento de resíduos agro-industriais especialmente, através do desenvolvimento de biorreatores melhor adaptados aos processos e pelos sistemas de recuperação de produtos dessa fermentação. Muitos obstáculos ainda devem ser ultrapassados para a máxima exploração das fermentações, como a obtenção de cepas capazes de solucionar problemas como a descontaminação de substratos, da produção minimizada de metabólitos indesejáveis e com alto potencial de geração do produto alvo (DASILVA e SASSON, 1995, HOLZAPFEL, 2002).

Aparentemente, a mola propulsora das pesquisas sobre aproveitamento de resíduos foi o conceito estabelecido durante o desenrolar da exploração espacial, de que a cápsula espacial era um sistema ecológico fechado, no qual todos os detritos deveriam ser reutilizados ou reciclados (UPDEGRAFF et al., 1973). Inicialmente, foi estudado o aproveitamento de dejetos através do crescimento de microrganismos nesse material, seguido da recuperação da biomassa resultante, visando utilizá-la na ração animal, como fonte de proteínas. Esse

conceito se estendeu a pesquisas sobre outros subprodutos (bagaços, resíduo do processamento de alimentos e de indústrias de papel e celulose) que serviriam de substratos para crescimento de microrganismos (BEN-GERA e KRAMER, 1969; DETROY e HESSELTINE,1978; FALANGHE,1964;). Os trabalhos que se iniciaram a partir de então, visavam a utilização de uma variedade muito grande de substratos de acordo com a tecnologia e os materiais típicos de cada país (ASHOUR et al. 1996; BABU et al. 1996; BIRK et al., 1996; DANTOUR et al., 1996; DHANDA et al. 1996; GONZALEZ-SISO e SISO, 1996).

As aplicações da biotransformação dos resíduos e subprodutos (sólidos e líquidos) trouxeram como conseqüências, a melhoria do saneamento do ambiente, estabelecimento de indústrias secundárias e melhoria de estrutura e de preços. No entanto, muitas propostas de aplicação destes processos não tiveram sucesso, sendo, para muitas delas apresentadas razões semelhantes, como as econômicas, políticas e psicológicas (WINKLER, 1983).

O aproveitamento de resíduos agrícolas para obtenção de um produto de valor comercial, através de um processo fermentativo sólido, poderia ser visto como uma tentativa de se agregar valores a um produto de descarte, possibilitando uma fonte de renda alternativa para propriedades rurais, cumprindo assim, uma função ambiental e social (HOLZAPFEL, 2002, MOTARJEMI, 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a produção de pectinases (Poligalacturonase e PL) através da fermentação em estado sólido, utilizando como substrato os resíduos agrícolas e agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de cana e laranja, casca de banana, manga, tegumento do grão de milho e polpa de maçã) por *P. viridicatum RFC3*.
- Avaliar o efeito do tempo de fermentação sobre a produção das enzimas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1-Microrganismo

O microrganismo estudado foi o *Penicillium viridicatum* RFC3 isolado a partir de amostra de hortaliça em decomposição e selecionado como bom produtor de pectinases. Este fungo foi identificado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas -SP.

2-Meios de cultivo

2.1-Meio de manutenção

O fungo foi mantido em meio Agar Sabouraud Dextrose (Oxoid) acrescido de pectina cítrica a 0,3%. A cultura estocada foi transferida para tubo criogênico em meio com glicerol a 20%, sendo mantida a -20°C. Também foi estocado em meio inclinado com a adição de óleo mineral e mantido em geladeira a 7°C.

2.2-Meio para o estudo da produção das enzimas

Foram testados os seguintes resíduos agrícolas e agro-industriais: bagaço de laranja, fornecido pela Citrovita S/A, Catanduva - S.P.; bagaço de cana, fornecido pela usina Guarani, Olímpia - S.P.; casca de banana, manga e polpa de maçã, obtidas de frutas adquiridas no mercado; farelo de trigo adquirido no mercado; resíduo do processamento de

milho (tegumento do grão), obtido a partir do processamento de germe de milho (Lab. de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE / UNESP / S. J. Rio Preto).

As cascas de frutas e os bagaços de cana e laranja foram secos a 65°C por aproximadamente 24h, em estufa de circulação forçada de ar, e moídas. A polpa de maçã foi obtida após a extração do suco, por prensagem em pano poroso, seca e moída, nas mesmas condições descritas anteriormente. O resíduo de milho foi peneirado de forma a separar os restos de grãos, selecionando-se os restos dos tegumentos que envolvem os grãos. Os materiais foram selecionados com relação a sua granulometria, utilizando peneira ABNT 14, Tyler 12 com abertura 1,41 mm.

Após autoclavagem a 121°C por 30 minutos, os resíduos foram hidratados com solução nutriente, até umidade entre 70-95%. A solução nutriente usada foi composta por $(NH_4)_2SO_4$ a 0,1% e $MgSO_4 \times 7H_2O$ a 0,1%.

3-Análise do substrato

3.1. Determinação da umidade do substrato

Foi utilizada uma amostra de aproximadamente de 0,2g de material já processado, o qual foi seco a uma temperatura de 65°C em estufa até peso constante. A diferença entre o peso inicial e o peso final, após a secagem, foi usada para o cálculo da umidade expressa em porcentagem (%).

3.2. Determinação dos açúcares redutores

Foi feita uma suspensão de 0,5g do substrato em 10mL de H_2O e mantido em agitação por 2 horas a 150 rpm. A separação das partículas sólidas, após o período de agitação, foi feita por filtração usando papel Whatman n°1. O filtrado foi usado como amostra para análise dos açúcares redutores.

Os açúcares totais foram determinados tratando-se as amostras com HCl 2N, na proporção 1:1, em ebulição por 10 minutos, visando à hidrólise dos açúcares. Após a neutralização com NaOH 2N, seguiu-se o procedimento para a dosagem dos açúcares redutores, utilizando-se o método do DNS (Miller, 1959).

Foram também quantificados os açúcares redutores livres na amostra (açúcares não hidrolisados) tomando-se alíquotas de 1mL, diretamente do filtrado e seguindo a mesma metodologia citada.

4-Inóculo

A padronização do inóculo é uma etapa importante, visto que em processos fermentativos, a população microbiana inicial é um fator de variação da resposta final.

Desse modo, a cultura esporulada (em ágar inclinado) foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,01% procedendo-se a contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer. Foram

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

utilizados volumes de suspensão suficientes para se obter um inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato.

5-Estudo da produção da enzima em fermentação semi-sólida.

A fermentação semi-sólida, para a produção das pectinases ocorreu em erlenmeyers de 250 mL contendo 10g dos resíduos citados anteriormente, devidamente secos e moídos. Após o inoculo com 10^7 esporos por grama de substrato, ocorreu à hidratação até 80% de umidade, com a solução nutriente (item 2.2) e o material foi incubado em estufa a 28 °C.

As amostras foram coletadas retirando-se um frasco a cada período de 48 horas, durante 15 dias.

As enzimas foram extraídas pela adição de 8mL de água por grama de substrato, o qual foi homogenizado e mantido em agitação a 100rpm por 30 minutos. O material foi filtrado a vácuo a fim de se obter a solução enzimática bruta.

6-Medida da atividade enzimática

6.1. Atividade de poligalacturonases (PG)

A atividade de PG foi avaliada numa mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato 0,2M, pH 5,0, contendo 1% de pectina com 64-72% de esterificação e 0,2 mL de enzima. O açúcar redutor liberado (ac. D-galacturônico) após a incubação da mistura de reação

a 55°C por 10 min., foi quantificado pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

6.2. Atividade de pectina liase (PL)

A mistura de reação para determinar atividade de PL foi de 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5, contendo 1% de pectina com 64 - 72% de esterificação e 0,5 mL de enzima. A incubação foi a 55°C por 30 min. e a interrupção da reação ocorreu por adição de 10 mL de HCl a 0,2N. A quantificação dos produtos foi feita pela leitura da absorbância a 235nm segundo o método de Albersheim (1966). Uma Unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove liberação de 1µmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5500.

7-Análise estatística dos experimentos

Foram feitas análises de variância através de um delineamento fatorial 5X7 (RESÍDUOS AGRÍCOLAS X TEMPO), 5X6 (RESÍDUOS COMBINADOS COM BAGAÇO DE CANA X TEMPO) para a produção de Exo-PG e PL . Os desdobramentos das médias das atividades das enzimas foram feitos através do teste de Tukey, tendo como significância os valores maiores que a diferença

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

mínima significativa (Δ) sendo calculados pela seguinte fórmula:

$\Delta = q\frac{\sqrt{QMR}}{\sqrt{r}}$, onde o valor de q é obtido a partir de uma tabela de "range studentizado", QMR é o quadrado médio dos resíduos e r é o número de repetições dos experimentos.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa ***Estat*** (de livre distribuição), desenvolvido pelos Drs. Sergio do Nascimento Kronka e David Ariovaldo Banzatto, na Unesp de Jaboticabal.

4. RESULTADOS

1. Análise do substrato a ser utilizado durante a fermentação inicial.

Foram feitas determinações dos teores de açúcares redutores e açúcares totais dos substratos utilizados assim como, da mistura de farelo de trigo com o bagaço de laranja 1:1 (p/p), obtendo-se os dados apresentados na tabela 1. Também foram determinados os teores de umidade do substrato.

Tabela 1: Análise dos substratos utilizados nos ensaios fermentativos semi-sólidos.

Resíduo	Açúcares (mg/g)		Umidade (%)
	AT	AR	
Farelo de trigo	1,40	1,31	24,95
Bagaço de cana	0,86	0,85	0,90
Bagaço de laranja	3,08	1,98	10,49
Tegumento de milho	0,85	0,87	2,41
Casca de manga	4,88	1,33	4,78
Casca de banana	5,60	2,20	5,15
Polpa de maçã	4,65	2,70	7,68

***Açúcar Redutor (AR), Açúcar Redutor Total (ART)**
Não Determinado (ND)

2. Produção de poligalacturonase e PL em resíduos agro-industriais e análise fatorial dos dados.

Numa primeira etapa do trabalho, foi estudada a produção de Exo-poligalacturonase (Exo-PG) e de PL (PL) por *P. viridicatum RFC3*, em frascos erlenmeyers utilizando como substrato 10 g de farelo de trigo, tegumento do grão de milho, bagaço de laranja, casca

de banana, casca de manga ou de polpa de maçã. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 1A (apêndice) e analisados estatísticamente conforme descrito no item 7.

2.1. Exo-poligalacturonase

Foram feitas as análises fatoriais 6X7 (Resíduos X Tempo de cultivo) da produção da Exo-poligalacturonase por *P. viridicatum RFC3* nos diferentes resíduos agro-industriais ao longo de 336 horas de cultivo (amostras tomadas a cada 48 horas). Os valores utilizados consistiram de unidade de enzima por mililitro de solução enzimática obtida pela suspensão do material fermentado em água, na proporção de 8mL de tampão para cada grama de material.

Observou-se que, separadamente, resíduos agro-industriais afetaram a produção da enzima a 1% de probabilidade, segundo o teste F, enquanto que o tempo de cultivo não apresentou diferença significativa a 5% de probabilidade. Quando esses fatores interagem entre si, a análise estatística mostrou que a interação não foi capaz de produzir uma diferença significativa a 5% de probabilidade, na produção da enzima, segundo o teste F. A média geral do ensaio foi de 0,57 U/mL, o desvio foi de 0,66 U/mL e o coeficiente de variação foi de 115,49 U/mL (Tabela 2).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 2: Análise de variância da atividade da Exo-Poligalacturonase obtida nos ensaios fermentativos.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Resíduos (R)	5	21,5163	4,3033	9,84**
Tempo (T)	6	0,9662	0,1610	0,37NS
Fator R x T	30	7,0120	0,2337	0,53NS
(Tratamentos)	41	29,4945	0,7194	-
Resíduo	42	18,3675	0,4373	-
Total	83	47,8620	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Foi aplicado o teste de Tukey para o fator "substrato" utilizado e "tempo de cultivo". O teste revelou que o farelo de trigo proporcionou uma maior produção da enzima em relação aos demais resíduos, com uma média de 1,62 U/mL. As demais médias de produção ficaram abaixo de 0,70 U/mL (Tabela 3). Embora não tenham sido estatísticamente diferentes entre si, nota-se que a quantidade da enzima PG produzida variou com o tipo de substrato usado, sendo menor naqueles derivados de frutas, os quais apresentaram os maiores teores de açúcares redutores (Tabela 1).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 3: Teste de Tukey para as médias de produção de Exo-PG resíduos agro-industriais utilizados nos ensaios fermentativos.

Resíduos	Δ	Média
Farelo de trigo	0,7458	1,6214^{A}
Tegumento de milho	0,7458	0,7000^{B}
Bagaço de laranja	0,7458	0,4143^{B}
Casca de banana	0,7458	0,3643^{B}
Casca de manga	0,7458	0,2786^{B}
Polpa de maçã	0,7458	0,0571^{B}

Para o fator tempo de cultivo (Tabela 4), também foi aplicado o teste de Tukey que revelou que a maior média de produção da enzima foi obtida a 288 horas de cultivo (0,7042 U/mL), embora sem significância estatística.

Tabela 4: Teste de Tukey para as médias dos tempos de cultivo para a produção de Exo-Poligalacturonase, nos ensaios fermentativos.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
288	0,8359	0,7042^{A}
192	0,8359	0,6750^{A}
96	0,8359	0,6500^{A}
240	0,8359	0,6125^{A}
48	0,8359	0,4875^{A}
144	0,8359	0,4750^{A}
336	0,8359	0,4042^{A}



Esses resultados indicaram que a produção da PG por *P. viridicatum RFC3* deve ser feita em farelo de trigo, por períodos de fermentação mínimos de 96 horas.

2.2. Pectina liase

Os dados obtidos no estudo da produção de PL foram analisados estatísticamente da mesma maneira que a Exo-PG, quanto aos fatores substratos usados na fermentação (farelo de trigo, bagaço de laranja, casaca de banana, casca de manga e maçã) e tempo de cultivo (amostras tomadas a cada 48 horas). Os valores utilizados consistiram de unidade de enzima por mililitro de solução enzimática bruta obtida pela suspensão do material fermentado em água, na proporção de 8mL de água para cada grama de material. A média geral do ensaio foi de 50,88 U/mL, o desvio foi de 92,01 U/mL e o coeficiente de variação foi de 180,8148 U/mL (Tabela 5).

A análise de variância dos dados não indicou efeito significativo dos substratos usados, nem dos tempos de cultivo, ao nível de 5% de probabilidade, sobre a produção da enzima. Da mesma forma, não se obteve significância para as interações entre os fatores "substrato e tempo".

Tabela 5: Análise de variância da atividade da PL obtida nos ensaios fermentativos.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Resíduos (R)	5	93063,5577	18612,7115	2,20^{NS}
Tempo (T)	6	41304,7528	6884,1255	0,81 ^{NS}
Fator R x T	30	202594,4452	6753,1482	0,80^{NS}
(Tratamentos)	41	336962,7557	8218,6038	-
Resíduo	42	355578,3701	8466,1517	-
Total	83	692541,1258	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Os testes de Tukey para as médias dos resíduos e tempos de cultivo indicaram que o farelo de trigo e bagaço de laranja, apresentaram uma maior produção da enzima (90,35 e 85,68 U/mL respectivamente) (Tabela 6) e o melhor tempo de cultivo foi a 144 horas com 85,95 U/mL (Tabela 7) embora as diferenças entre as médias não tenham sido significativas ao nível de 5%.

Deve ser ressaltado que houve muita variação entre as repetições, o que possivelmente levou a não significância das diferenças entre as médias. Esse tipo de variação é comum em fermentação em estado sólido. Por outro lado, as produções das enzimas apresentou mais de um pico ao longo do percurso fermentativo o que afetaria a significância do fator "tempo de cultivo" no tipo de análise realizada.

Ao se analisar conjuntamente os dados das produções de PG e PL, verifica-se que o farelo de

trigo favoreceu a produção de ambas as enzimas, embora o bagaço de laranja tenha também proporcionado razoável produção das mesmas. Considerando um processo fermentativo no qual pretende-se obter os dois tipos de enzimas, ambos os substratos poderiam ser usados ou uma mistura destes.

Tabela 6: Teste de Tukey para as médias de produção de PL nos resíduos agro-industriais, utilizados nos ensaios fermentativos.

Resíduos	Δ	Média
Farelo de trigo	103,7747	90,3493^{A}
Bagaço de laranja	103,7747	85,6836^{A}
Casca de banana	103,7747	75,4429^{A}
Polpa de maçã	103,7747	21,0664^{A}
Casca de manga	103,7747	18,2721^{A}
Tegumento de milho	103,7747	14,5093^{A}

Tabela 7: Teste de Tukey para as médias das produções de PL, em relação ao tempo de cultivo, nos diferentes resíduos.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
144	116,3014	85,9525^{A}
96	116,3014	77,9000^{A}
240	116,3014	56,1933^{A}
288	116,3014	40,7767^{A}
192	116,3014	38,5967^{A}
336	116,3014	38,1333^{A}
48	116,3014	18,6583^{A}

2.3. Combinação dos resíduos com bagaço de cana como substrato inerte

Em ensaios utilizando bagaço de cana-de-açúcar como único substrato não houve crescimento do microrganismo, indicando que o mesmo não conseguiu utilizar as fibras do bagaço como fonte de carbono. Em função disso, realizaram-se experimentos nos quais o bagaço foi misturado com outros resíduos, nos quais houve bom crescimento microbiano e boa produção das enzimas. O objetivo desses ensaios foi avaliar se a redução da compactação dos substratos, promovida pelas fibras do bagaço, favorecia a produção das pectinases. Os dados obtidos são apresentados na tabela 2A (apêndice). Nesses experimentos foram utilizados farelo de trigo, casca de banana, casca de manga, tegumento de milho e bagaço de laranja misturados ao bagaço de cana na proporção 1:1.

2.3.1. Produção da Exo-poligalacturonase

Foram feitas análises fatoriais 5X7 para as produções de Exo-PG nos diferentes substratos combinados com bagaço de cana como substrato inerte na proporção 1:1 (p/p) ao longo do período fermentativo de 336 horas (amostras tomadas a cada 48 horas). A análise de variância desses dados mostrou que existiu efeito significativo, a 1% de probabilidade do tipo de resíduo usado, sobre a produção da enzima. Para o tempo de cultivo a interação dos fatores estudados não apresentou

efeito significativo. A média geral do ensaio foi de 0,9386 U/mL, o desvio padrão foi de 0,4446 U/mL e o coeficiente de variação foi de 47,3667 U/mL (Tabela 8).

Tabela 8: Análise de variância da atividade da Exo-PG obtida pela combinação dos resíduos com o bagaço de cana.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Res. Combinados (RC)	4	38,7930	9,6982	49,07**
Tempo (T)	6	1,3104	0,2184	1,10 NS
Fator RC x T	24	3,1500	0,1313	0,66NS
(Tratamentos)	34	43,2534	1,2722	-
Resíduo	35	6,9175	0,1976	-
Total	69	50,1709	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey, aplicado para os substratos utilizados, indicou que a combinação do farelo de trigo com o bagaço de laranja mostrou ser o mais eficiente na indução da produção da Exo-PG com média de 2,3607 U/mL. A menor produção foi obtida na mistura de casca de manga com o bagaço de cana (Tabela 9). As produções obtidas em fermentações cujos substratos consistiram de mistura de bagaço de cana com bagaço de laranja ou casca de banana foram muito semelhantes.

unesp

Tabela 9: Teste de Tukey para as médias das atividades de Exo-PG obtidas pelo cultivo de *P. viridicatum* RFC3 na mistura dos resíduos com bagaço de cana.

Resíduos	Δ	Média
Farelo de trigo + bagaço de cana	0,4831	$2,3607^{A}$
Bagaço de laranja + bagaço de cana	0,4831	$0,8393^{B}$
Casca de banana + bagaço de cana	0,4831	$0,7929^{B}$
Tegumento de milho + bagaço de cana	0,4831	$0,4607^{BC}$
Casca de manga + bagaço de cana	0,4831	$0,2393^{C}$

O teste de Tukey para a produção média de PG, ao longo do período fermentativo, mostrou que a maior produção ocorreu em 144 horas de cultivo, embora não tenha havido nenhum contraste significativo entre as médias (Tabela 10).

Tabela 10: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Exo-PG em relação ao tempo de cultivo nas misturas dos resíduos com bagaço de cana.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
144	0,6214	$1,1500^{A}$
192	0,6214	$1,0100^{A}$
240	0,6214	$0,9550^{A}$
288	0,6214	$0,9500^{A}$
96	0,6214	$0,9300^{A}$
336	0,6214	$0,9200^{A}$
48	0,6214	$0,6550^{A}$

A semelhança entre os dados obtidos, sugere que a fermentação pode ser realizada com 96 horas de cultivo.

2.3.2. Produção da PL

Foram testadas também as produções de PL nos diferentes resíduos (farelo de trigo, bagaço de laranja, casca de banana, casca de manga e maçã) combinados com bagaço de cana como substrato inerte. A análise de variância desses dados mostrou que não existe diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre os resíduos analisados, assim como, para o fator tempo de cultivo e para as interações entre esses fatores. A média geral do ensaio foi de 62,1609 U/mL, o desvio padrão foi de 71,1781 U/mL e o coeficiente de variação foi de 114,5064 U/mL (Tabela 11).

Tabela 11: Análise de variância da atividade da PL obtida pelo cultivo do fungo *P. viridicatum RFC3* combinado com o bagaço de cana.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Res. Combinados (RC)	4	39767,7630	9941,9407	1,96^{NS}
Tempo (T)	6	36684,9576	6114,1596	1,21^{NS}
Fator RC x T	24	79404,6965	3308,5290	0,65^{NS}
(Tratamentos)	34	155857,4170	4584,0417	-
Resíduo	35	177321,4497	5066,3271	-
Total	69	333178,8667	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey aplicado, indicou, embora de forma não significativa, que a mistura da casca de manga com o bagaço de cana foi o melhor substrato na indução da produção da PL, com 101,35 U/mL (Tabela 12).

Embora a menor produção média tenha sido cerca de três vezes menor que a maior produção, a análise estatística não revelou significância dos dados, sugerindo que os desvios entre as repetições foram muito altos. Conforme já observado anteriormente, as repetições em fermentação semi-sólida dificilmente geram dados muito consistentes. Em adição a isso, o método de dosagem da PL, por absorbância de luz UV, é muito sensível às variações de turbidez, coloração e micropartículas presentes na amostra, os quais levam às diferenças de leitura e conseqüentemente, refletem na expressão da atividade enzimática. Métodos alternativos devem ser avaliados para estudos de produção de PL em condições similares às dos nossos experimentos.

Na comparação das produções de PG e PL nos resíduos utilizados isoladamente, com aqueles obtidos quando estes foram misturados com bagaço de cana, percebe-se uma elevação das produções médias tanto para a PG quanto para a PL. Em substratos como casca de banana, bagaço de laranja e farelo de trigo, a adição de bagaço de cana promoveu um aumento de até 2 vezes na produção de PG.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 12: Teste de Tukey para as médias de produção de PL, nos resíduos combinados com bagaço de cana.

Resíduos	Δ	Média
Casca de manga + bagaço de cana	77,3427	101,3500[A]
Bagaço de laranja + bagaço de cana	77,3427	69,5557[A]
Casca de banana + bagaço de cana	77,3427	61,3986[A]
Farelo de trigo + bagaço de cana	77,3427	49,2421[A]
Tegumento de milho + bagaço de cana	77,3427	29,2579[A]

O teste de Tukey, aplicado para a produção média da enzima, ao longo do período fermentativo mostrou que o melhor tempo de cultivo foi de 336 horas, embora não tenha sido obtida diferença significativa entre as médias, ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 13).

Tabela 13: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da PL, em relação ao tempo de cultivo, para os resíduos combinados com o bagaço de cana.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
336	99,4876	100,3420[A]
240	99,4876	93,0990[A]
144	99,4876	57,7460[A]
288	99,4876	57,6470[A]
192	99,4876	43,4200[A]
48	99,4876	42,7470[A]
96	99,4876	40,1260[A]

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Visto que nesses experimentos, com mistura de resíduos agro-industriais, o farelo de trigo e o bagaço de laranja mostraram-se bons indutores da produção de Exo-PG e PL respectivamente, realizaram-se ensaios nos quais foi usado como substrato uma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja, na proporção de 1:1. O fungo foi cultivado nesse meio por 336 horas, em erlenmeyers.

Através da figura 3, observa-se que a produção de Exo-PG apresenta dois picos: o primeiro detectado a 96 horas de fermentação (1,6 U/mL), decresce até 204 horas quando se reinicia o aumento da produção, que atinge o máximo em 288h (1,8 U/mL). A produção de PL aumenta gradativamente até 336 horas de fermentação (54 U/mL).

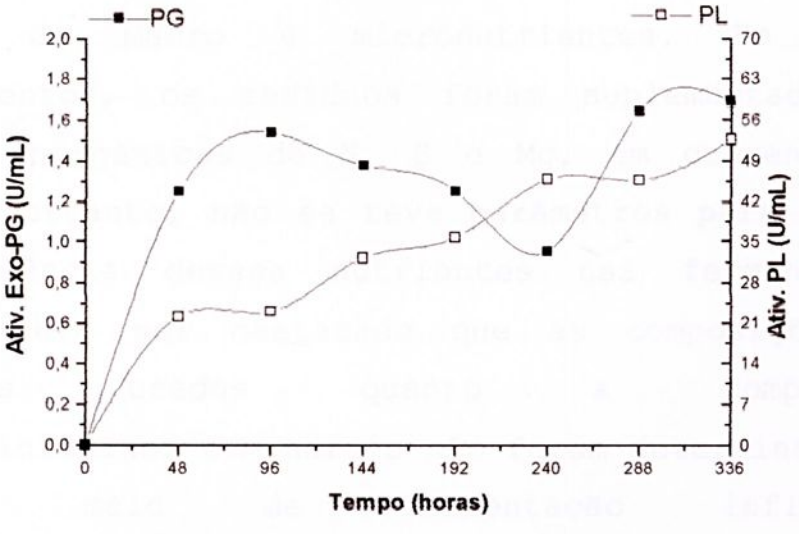


Figura 3: Produção de PL (PL) (□) e Exo-Poligalacturonase (Exo-PG) (■), por *P. viridicatum RFC3* cultivado em meio de Bagaço de Laranja combinado com Farelo de Trigo (1:1 - p/p).

5. DISCUSSÃO

O fungo *P. viridicatum* RFC3 estudado foi inoculado com 10^7 esporos/g de substrato, definido com base em dados da literatura, ficando próximo ao de Acuña-Argüelles *et al.* (1995), que usou 2 x 10^7 esporos/g de substrato e, abaixo do de Berovic e Ostroversnic, (1997) que usaram 5 x 10^8 esporos/g para o cultivo de *Aspergillus niger* em polpa de maçã.

A nutrição suplementar do resíduo influencia o crescimento microbiano conforme constatado por Acuña-Argüelles *et al.* (1995) e Gutierrez-Correa *et al.* (1999), em cultivo de *Aspergillus niger* em bagaço de cana. Estes autores concluíram que os nutrientes no meio são fatores limitantes para o sucesso da fermentação e recomendam a adição de fontes de macro e micronutrientes. Em nossos experimentos, os resíduos foram suplementados com fontes inorgânicas de N, S e Mg, em concentrações fixas, portanto, não se teve parâmetros para avaliar a influência desses nutrientes nas fermentações. Ainda, deve ser destacado que as composições dos resíduos usados quanto a componentes lignocelulósicos e minerais não foram determinadas.

O meio de fermentação influenciou significativamente na produção das enzimas nos diversos resíduos agrícolas analisados, principalmente em relação a Exo-Poligalacturonase, cujos ensaios mostraram o farelo de trigo como melhor indutor da enzima assim como, para a PL, que

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

além do farelo de trigo, teve o bagaço de laranja como bom indutor. Esses resultados assemelham-se com os obtidos para endoglucanases e β - glucosidases (GRAJEK, 1987), xilanases (TREJO-HERNANDEZ *et al.*, 1991) e pectinases produzidas por *Aspergillus niger*, usando os mesmos meios fermentativos (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1995).

Além da fonte de carbono, o tempo de cultivo foi um fator que influenciou, embora sem significância estatística, a produção da PG nos diversos substratos. Os resultados mostram ainda que o *P. viridicatum RFC3*, quando cultivado separadamente em diversos resíduos, apresentou pico de produção média da Exo-PG em 288 horas de cultivo. Esses substratos quando misturados com o bagaço de cana tiveram seu pico de produção diminuído pela metade (144 horas). Para a PL o pico de produção média ocorreu em 144 horas de cultivo quando os resíduos foram estudados separadamente, entretanto, quando a mistura foi utilizada, ocorreu o inverso, com um aumento no tempo de produção máxima da enzima para 336 horas. Esse efeito do tempo de cultivo na produção das enzimas assemelha-se ao descrito por Acuña-Argülles *et al.* (1995) e Hang e Woodams (1994).

Durante o processo fermentativo, o consumo dos açúcares prontamente assimiláveis, que estavam presentes em grandes quantidades em alguns resíduos, promoveram melhor crescimento fúngico e sucesso na colonização do meio fermentativo corroborando os dados de Sato e Sudo (1999). Entretanto, a redução

desses açúcares do meio é importante para se evitar a repressão catabólica e iniciar a produção das enzimas despolimerizantes (SOLÍS-PEREIRA *et al.*, 1993; ACUÑA-ARGÜLLES *et al.*, 1995; HANG e WOODAMS, 1994). Solís-Pereira *et al.* (1993) reportaram que a presença de glicose no meio reprimiu a produção de pectinases enquanto que, açúcares como galacturonatos, estimularam a produção dessas enzimas por *Aspergillus niger* CH4, em FSS, cujo substrato era constituído por cana-de-açúcar como substrato inerte e suplementado com nutrientes como sulfato de amônio e de magnésio, pectina e açúcares. Os elevados teores de açúcares redutores presentes nos substratos como casca de manga e banana e polpa de maçã e bagaço de laranja podem ter exercido repressão sobre a produção das pectinases, visto que, apesar do intenso crescimento micelial, a quantidade de enzima produzida não foi significativa.

O tempo de fermentação mostrou-se importante também para a produção das enzimas no farelo de trigo combinado com o bagaço de laranja nos diferentes birreatores. O aumento da produção de pectinases foi mais acentuado após 240 horas de cultivo (10 dias), corroborando os dados de outros processos fermentativos semi-sólidos como o descrito em ensaios com *Aspergillus niger* em bagaço de cana e casca de laranja, visando a produção de pectinases, nos quais o pico de produção da enzima ocorreu após 15 dias de fermentação (ACUÑA-ARGÜELLES *et al*, 1995; RIZZATTO, 1999).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

A mistura de um substrato inerte como o bagaço de cana foi um fator que favoreceu a produção de pectinases, principalmente naqueles substratos como as cascas de banana e manga, caracterizados pelo alto teor de açúcares e pela forte compactação das partículas quando umidecidas. O uso do bagaço de cana propiciou uma melhor penetração das hifas no meio fermentativo, devido provavelmente, à criação de espaços no meio, o que também pode ter facilitado a oxigenação e possivelmente a troca de calor, com redução da temperatura. Segundo Ooiijkaas *et al.* (2000) a presença de um substrato inerte no meio fermentativo favorece a homogeneidade da umidade, devido ao melhor controle da evaporação. Embora nossos dados tenham indicado que a adição do bagaço de cana aos substratos avaliados tenha aumentado a produção da pectinases, as razões pelas quais isso ocorreu, são meramente especulativas visto que não houve, nos ensaios, controle de fatores como o crescimento microbiano, umidade de substrato ou temperatura do sistema.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

6. CONCLUSÕES

- A fonte de carbono e seus teores de açúcares prontamente assimiláveis foram fatores que possivelmente interferiram na repressão e/ou indução da Exo-PG e Pl, produzidas pelo fungo.
- O tempo de fermentação influenciou a produção da Exo-PG e PL pelo *P. viridicatum RFC3*, quando cultivado em diferentes resíduos agro-industriais, embora não tenha havido diferenças significativas nas produções médias ao longo do percurso fermentativo.
- Os resíduos farelo de trigo e bagaço de laranja, foram os substratos que proporcionaram maiores produções de PG e PL
- A mistura de resíduos com bagaço de cana-de-açúcar elevaram as produções médias de PG e PL, quando comparados com as produções nesses substratos isolados.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

VII - CAPITULO II: FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE FARELO DE TRIGO E BAGAÇO DE LARANJA EM ERLENMEYERS E EMBALAGENS DE POLIPROPILENO PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Penicillium viridicatum* RFC3

1. INTRODUÇÃO

A fermentação semi-sólida pode ser definida como o tipo de fermentação que ocorre perto ou próximo da ausência de água livre e pode ter como fontes de carbono e energia apenas o substrato (fermentação em substrato sólido) ou o substrato associado a um outro material como suporte sólido inerte (fermentação em estado sólido), segundo Pandey *et al.* (2000b) e Mitchell e Losane. (1992).

Dentre os fatores que afetam o processo fermentativo estão o crescimento microbiano e sua atividade no substrato em particular. A maneira com que o microrganismo degrada a partícula, o "pool" de enzimas necessário a essa degradação, além do tamanho da partícula do substrato, devem ser considerados (PANDEY *et al.*, 2000b).

O crescimento de fungos em substratos sólidos é único para cada substrato, pois este depende da penetração das hifas no substrato, assim como, na própria composição do mesmo. Ainda, devem ser consideradas as condições físico-químicas, como pH, temperatura e potencial de água livre, pois afetam diretamente o crescimento microbiano e conseqüentemente, sua ação sobre o substrato ou sobre o produto desejado no processo fermentativo.

O controle do pH durante a FSS, embora seja um dos pontos mais críticos, dificilmente é conseguido devido à

heterogeneidade e a consistência do material utilizado. Como tentativa de amenizar o efeito da variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato, como amônia ou uréia, cuja hidrólise desta última libera amônia que rapidamente alcaliniza o meio de cultivo (LOSANE *et al.*, 1985).

A temperatura na FSS é um fator muito importante pois enzimas e outros metabólitos produzidos pelo microrganismo, geralmente estão sujeitos à desnaturação pelo calor e ainda, a temperatura mais adequada para sua produção nem sempre coincide com a temperatura ótima de crescimento microbiano. Além disso, a atividade de água do meio (a_w) irá depender da temperatura e do tipo de substrato usado. Baixas a_w favorecem o crescimento fúngico evitando a contaminação do meio por bactérias (SATO e SUDO, 1999).

A escolha de um fermentador deve ser feita em função do objetivo da fermentação. Fatores como a análise econômica dos custos operacionais, do monitoramento, dos processos de carga, recarga e manutenção, devem ser previamente estudados. Num processo de maior escala deve-se verificar se as condições dos processos realizados na bancada poderão ser reproduzidas em larga escala (RIZZATTO, 1999).

Os microrganismos podem produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares em FSS como pectinases, celulases, amilases, proteases entre outras. A produção da enzima é regulada por mecanismos fisiológicos como repressão catabólica pela glicose tanto em FSM como em FSS (SILVA *et al.*, 2002 e SATO e SUDO, 1999).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Em vista destas considerações, propõem-se avaliar os efeitos da umidade e do tipo de biorreator sobre a produção de pectinases por FSS, assim como, avaliar a produção de outros tipos de enzimas despolimerizantes no sistema.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar produção de PG (endo e Exo) e PL pelo *P. viridicatum RFC3* em erlenmeyers e embalagens de polipropileno através da fermentação semi-sólida da mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja.
- Estudar dentro de cada biorreator (erlenmeyer e embalagens de polipropileno), quais as melhores condições de umidade do substrato (70 e 80%) e tempo de fermentação (48-336 h) para a produção de pectinases.
- Estudar a produção de outras enzimas despolimerizantes como celulases, xilanase e amilase, durante o processo fermentativo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1-Microrganismo

O microrganismo a ser estudado e a manutenção da cultura estão descritos no item 1 e 2.1 do capítulo 1.

2-Meio para o estudo da produção das enzimas

Foi testada a seguinte combinação de resíduos: bagaço de laranja, fornecido pela Citrovita Agro-industrial Ltda - Catanduva-SP e farelo de trigo adquirido no mercado.

O bagaço de laranja foi seco em estufa 60°C, moído e misturado ao farelo de trigo na proporção de 1:1 (p/p). Os resíduos, após misturados e homogeneizados, foram esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos. Os meios foram hidratados com água até 70 e 80% de umidade considerando o volume de água a ser adicionada com o inóculo e da solução nutriente composta por $(NH_4)_2SO_4$ a 0,1% e $MgSO_4 \times 7H_2O$ a 0,1%.

3-Análises do substrato

A umidade e teores de açúcares (totais e redutores) foram determinados conforme descrito no item 3.1 e 3.2 do capítulo I.

3.1. Determinação do teor de cinzas

Foi pesado 1g do substrato já processado o qual foi carbonizado em bico de Bunsen por aproximadamente 40 minutos. Em seguida o material foi colocado em Mufla a 550°C por cerca de 4 a 8 horas, para a obtenção das cinzas

de coloração branca. As diferenças entre o peso inicial e final serviram para a determinação do teor cinzas do meio expresso em %.

4-Inóculo

Assim como no capítulo anterior foi mantida uma concentração de 10^7 esporos por grama de substrato para inóculo no meio fermentativo.

5-Estudo da produção da enzima em fermentação semi-sólida.

A fermentação semi-sólida, para a produção das pectinases, ocorreu em erlenmeyers de 250 mL contendo 10g da mistura dos resíduos citados anteriormente. Após a hidratação, a 70 e 80% de umidade, com solução nutriente (item 2.2), o material foi inoculado com 10^7 esporos por grama e incubado em estufa a 28 °C.

Foi também estudada a fermentação em embalagens de polipropileno de 20 x 15 cm, contendo 30g do material preparado e inoculado como descrito anteriormente (Figura 4).

As amostras foram coletadas retirando-se um frasco ou embalagem a cada período de 48 horas, durante 15 dias.



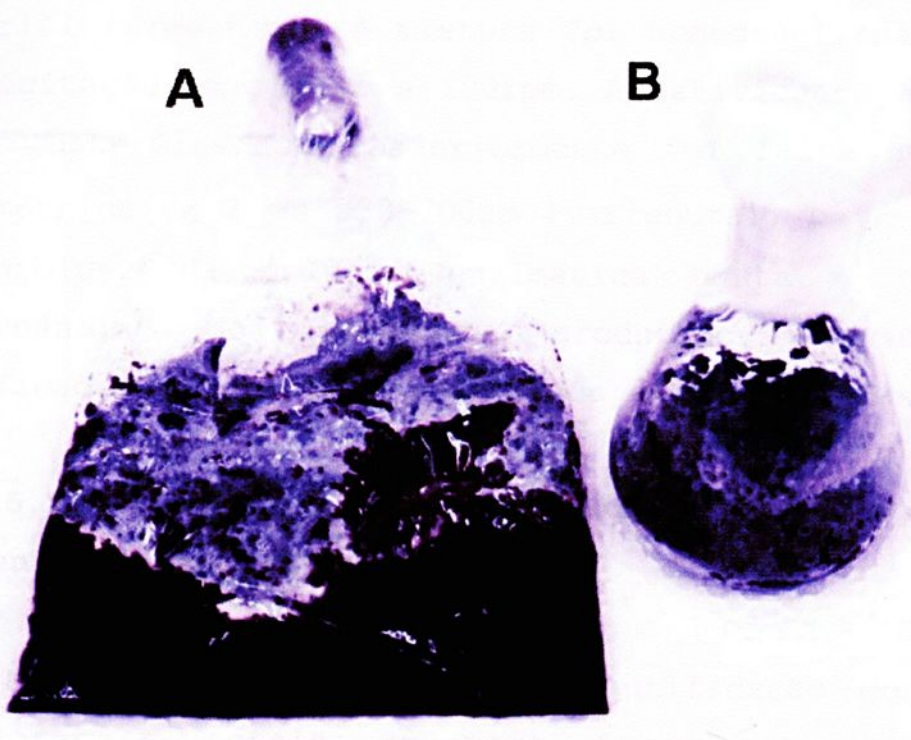


Figura 4: Biorreatores utilizados na fermentação semi-sólida por *Penicillium viridicatum RFC3*. Embalagem de polipropileno (A) e Erlenmeyer (B).

5.1. Estudo de extração das enzimas

Foram testadas as influências dos tempos de agitação da mistura de material fermentado e solvente (15, 30, 45 e 60 minutos), além do tipo de solvente (água, tampão acetato 10mM, pH 5,0 e tampão Tris/HCl 10mM, pH 7,0) na extração das enzimas a partir do material fermentado. Foram utilizados 8mL do solvente para cada grama do material fermentado. A mistura foi homogeneizada e mantida sob agitação em shaker a 100rpm. As atividades das enzimas foram determinadas. Posteriormente foi feita uma análise fotométrica em λ de 230-700nm (varredura), para se avaliar a turbidez da solução enzimática bruta e o pico de absorbância do pigmento produzido. Foram também verificados os pHs dos meios, após cada tempo de extração.

5.2. Quantificação dos açúcares, pH e proteínas presentes durante a fermentação.

Foram feitos testes para quantificação dos açúcares redutores e totais do meio fermentado cultivado em saquinhos de polipropileno e Erlenmeyers a 70 e 80% de umidade, ao longo do período fermentativo, segundo o método descrito no item 3.2 (cap. 1). Foi medido o pH da solução enzimática bruta após o processo de extração da enzima em cada tomada de amostra através do uso de pHmetro Digimed 2220. Quantificou-se também o teor de proteínas presentes no meio através do método descrito por Bradford, (1976).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

6-Medida da atividade enzimática

6.1. Atividade de poligalacturonases (PG)

A atividade de PG foi avaliada conforme descrito no item 6.1 do capítulo 1. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

6.2. Determinação da atividade de endo-poligalacturonase (Endo-PG).

A atividade de Endo-PG foi determinada através da medida da redução da viscosidade de solução de pectina após reação enzimática. Foram incubados volumes de soluções enzimáticas brutas com tampão citrato-fosfato a pH 5,5, contendo pectina, de forma que a concentração final do substrato foi de 3 %. As misturas de reação foram incubadas por dez minutos nas mesmas temperaturas utilizadas para a reação de PG. A viscosidade da mistura de reação foi determinada aplicando-se em viscosímetro basic da Fungilab em temperatura de 25°C. O controle foi feito usando-se uma mistura de enzima inativada, tampão e pectina em igual proporção à da amostra, foram medidos para cada série de experimento. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% a viscosidade da solução nas condições de ensaio.

unesp

6.3. Atividade de pectina liase (PL)

A mistura de reação para determinar atividade de PL foi feita conforme descrita no item 6.2 do capítulo 1. Uma Unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove liberação de 1μmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5550.

6.4. Atividade de pectina esterase (PE)

A atividade da PE foi medida por quantificação do metanol liberado enzimaticamente a partir das moléculas de pectina, através do método colorimétrico. A reação enzimática ocorrerá em mistura composta por 0,2mL de solução enzimática bruta e 0,8mL de tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, contendo 1% de pectina, incubada em temperatura de 45°C por 10 minutos. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de metanol por minuto nas condições de reação.

6.5. Atividade de amilase

A atividade da amilase foi medida através da mistura de reação que constou de 0,8mL de tampão citrato-fosfato a 0,2M e pH 5,0 a 0,3% de amido, com 0,2mL de enzima que foi incubada a 45°C por 10 minutos. O açúcar redutor liberado, após a incubação, foi quantificado pelo método do DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

6.6. Atividade de xilanase

A atividade da xilanase foi medida através da mistura de reação composta por 0,2mL do extrato enzimático bruto e 1,8mL de uma solução de 0,5% de xilana (Birchwood-Sigma) em tampão acetato 0,2M e pH 5,0. A incubação foi feita em temperatura de 45°C por 10 minutos. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1μmol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

6.7. Atividade da CMCase

A atividade da CMCase foi determinada pelo mesmo procedimento descrito para a xilanase, exceto que o substrato utilizado foi o carboximetilcelulose (CMC-Sigma) e a substância redutora foi quantificada a partir da curva padrão de glicose pelo método do DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

6.8. Atividade de protease

A atividade proteásica foi medida através da mistura de reação que constou de 0,8mL de tampão citrato-fosfato a 0,2M e pH 7,0 a 1% de caseína, com 0,2mL de enzima que foi incubada a 50°C por 30 minutos. A mistura de reação foi interrompida pela adição de TCA (ácido tricloroacetico) 5%

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

e centrifugada a 10000rpm por 10minutos. Foi retirado 1,2mL do sobrenadante e adicionado 1,4mL de NaOH 1M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma diferença de 1,0 na absorbância por 30 minutos a 50°C por mL de solução enzimática (LEIGHTON *et al.*, 1973).

7-Análise estatística dos experimentos

Foram feitas análises de variância através de um delineamento fatorial 2X7 (UMIDADE X TEMPO DE CULTIVO) para o estudo da influência desses parâmetros dentro do processo fermentativo nos dois biorreatores (erlenmeyers e embalagens de polipropileno) para a produção de três pectinases diferentes (Exo-PG, PL e Endo-PG). Os tratamentos aplicados são mostrados nas tabelas 1A, 2A e 3A (apêndice). Os desdobramentos das médias das atividades das enzimas foram feitos através do teste de Tukey, tendo como significância os valores maiores que a diferença mínima significativa (Δ) sendo calculados pela seguinte fórmula:

$\Delta = q\frac{\sqrt{QMR}}{\sqrt{r}}$, onde o valor de q é obtido a partir de uma tabela de "range studentizado", QMR é o quadrado médio dos resíduos e r é o número de repetições dos experimentos.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa ***Estat*** (de livre distribuição), desenvolvido pelos Drs Sergio do Nascimento Kronka e David Ariovaldo Banzatto, na Unesp de Jaboticabal.

4. RESULTADOS

1. Análise do substrato a ser utilizado durante a fermentação.

Foram feitas determinações dos teores de açúcares redutores e açúcares totais do substrato (mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo - 1:1), obtendo-se 2,4 e 4,04 mg de açúcar por grama de substrato respectivamente. Também foi determinado o teor de cinzas do substrato, que constou de 8,25%. A umidade natural do substrato foi de 8,98%.

Tabela 14: Análise físico-química do substrato utilizado na fermentação semi-sólida de *P. viridicatum RFC3*.

Açúcares (mg/g)	***AR****	***2,40***
	AT*	***4,04***
Umidade (%)		***8,98***
Teor de cinzas (%)		***8,25***

*** Açúcar Redutor (AR), Açúcar Redutor Total (ART)**

2. Estudo da produção das enzimas em FSS em diferentes biorreatores.

2.1. Ensaios para a extração das enzimas

Após 288 horas de cultivo em Erlenmeyers, utilizando substratos com 80% de umidade, foram feitos ensaios para determinar qual o melhor solvente e o melhor tempo para a extração das enzimas PG (endo e Exo) e PL. Os dados da Tabela 15 mostram que a extração das enzimas foi maior em tampão acetato, após 30 minutos de agitação, o qual permitiu extrair do material fermentado, 6,3 U/mL de Exo-

PG e 10,35 U/mL de Endo-PG. Porém, não foi detectada atividade de PL nesse material.

Nota-se entretanto, que quando foi utilizado água e tampão acetato, o pH final da solução esteve em torno de 6,5, sugerindo que a molaridade do tampão acetato usado não foi suficiente para evitar a variação do pH.

Tabela 15: Extração das pectinases utilizando diferentes solventes e tempos de agitação.

Solvente	Tempo (Minutos)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)	PL (U/mL)	Abs 322nm	pH
Água	15	3,9	9,7	0	0,54	6,38
	30	5,7	10,1	0	0,55	6,54
	45	5,1	9,5	0	0,57	6,48
	60	1,8	9,8	0	0,55	6,47
Tampão Acetato (pH 5,0, 10mM)	15	4,8	9,7	0	0,49	6,48
	30	6,3	10,3	0	0,51	6,54
	45	5,7	9,7	0	0,53	6,48
	60	4,5	9,8	0	0,51	6,48
Tampão Tris (pH 7,0, 10mM)	15	1,2	9,	0	0,53	6,88
	30	4,5	9,6	0	0,50	7,00
	45	6,0	10,1	0	0,64	7,00
	60	3,6	9,76	0	0,54	6,91

2.2. Quantificação dos açúcares redutores e totais e determinação de proteína ao longo do período fermentativo.

Na fermentação em embalagens de polipropileno observou-se a degradação dos açúcares totais e redutores ao longo de período de cultivo (Figura 5). Quando o teor de umidade inicial do meio foi de 80%, os açúcares totais, na primeira amostragem, ou seja, após 48h de cultivo,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

corresponderam a 1,32 mg/g e os açúcares redutores a 0,75 mg/g. Ao final do período fermentativo, os açúcares totais foram reduzidos a 0,29 mg/g (redução de 78,03%) e os redutores em 0,14 mg/g (redução de 81,3%).

Quando a umidade foi de 70%, notou-se que o consumo de açúcares totais foi levemente maior que a 80% de umidade. Na primeira amostragem, após 48 horas de cultivo, existia 0,62 mg/g de açúcares totais (redução de 84,65%) e 0,45 mg/g de açúcares redutores (redução de 81,25%). Ao final do período fermentativo, restaram 0,15 mg/g de açúcares totais (redução de 96,28%) e 0,10 mg/g de açúcares redutores (redução de 95,83%). O pH do meio, após 48 horas de cultivo, foi de 4,5 para ambos os teores de umidade, porém, o pH, ao final da fermentação, a 70% de umidade, foi maior (6,71) do que o de 80% (6,26).

O cultivo em Erlenmeyers apresentou características semelhantes àquelas obtidas em embalagens de polipropileno em relação aos teores de açúcar e na sua degradação ao longo da fermentação. Em maior teor de umidade (80%), os açúcares totais, após, 48 horas de cultivo, foram 1,34 mg/g (redução de 66,83%) e os açúcares redutores foram 0,79 mg/g (redução de 67,08%). Ao final do período fermentativo, os açúcares totais já estavam reduzidos a 0,28 mg/g (93,07%) e os redutores, a 0,19 mg/g (92,08%). Quando a umidade foi de 70%, notou-se que o consumo de açúcares totais foi menor que a 80% de umidade, embora, em 48 horas de cultivo, havia 0,83 mg/g de açúcares totais (redução de 79,45%) e 0,70 mg/g de açúcares redutores (redução de 70,83%). Ao final do período fermentativo restaram 0,36 mg/g de açúcares totais (redução de 91,08%) e 0,25 mg/g de açúcares redutores (redução de 89,58%). O pH do meio, após 48 horas de cultivo, apresentou pH de

unesp

5,97 para o meio hidratado a 70% de umidade e 4,5 para o meio a 80%. Ao final da fermentação, ambos os meio apresentaram características de pH semelhantes, com 6,5 e 6,2 para os meios a 70 e 80% de umidade respectivamente (Figura 6).

Quanto aos teores de proteínas, nos dois biorreatores estudados, o teor proteico inicial de 3,26 mg/g aumentou ao longo da fermentação até atingir 24,07 mg/g, em 336 horas (Figura 7).

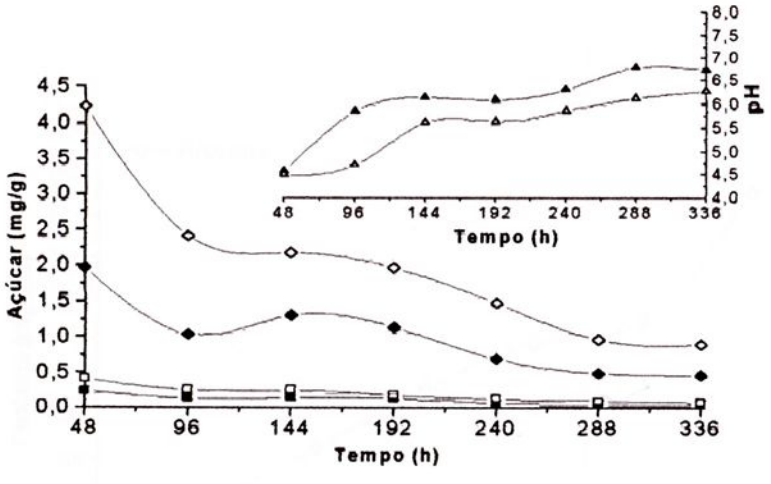


Figura 5: Teores de açúcares presentes no substrato fermentado pelo *P. viridicatum RFC3* em embalagens de polipropileno. Umidade de 70%: Açúcares Redutores(■) e açúcares Totais (◆). Umidade de 80% Açúcares Redutores(□) e açúcares Totais (◇). pH do meio a 70% (▲) e 80% (△) de umidade.

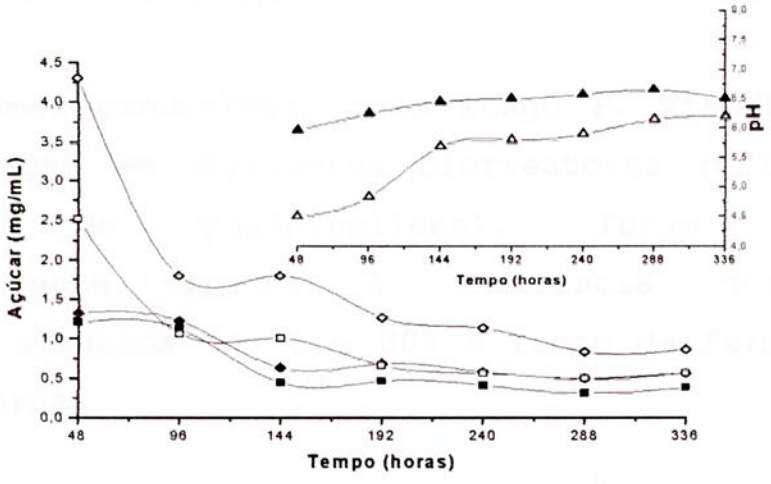


Figura 6: Teores de açúcares presentes no substrato fermentado pelo *P. viridicatum RFC3* em erlenmeyers. Umidade de 70%: Açúcares Redutores(■) e açúcares Totais (◆). Umidade de 80% Açúcares Redutores(□) e açúcares Totais (◇). pH do meio a 70% (▲) e 80% (△) de umidade.

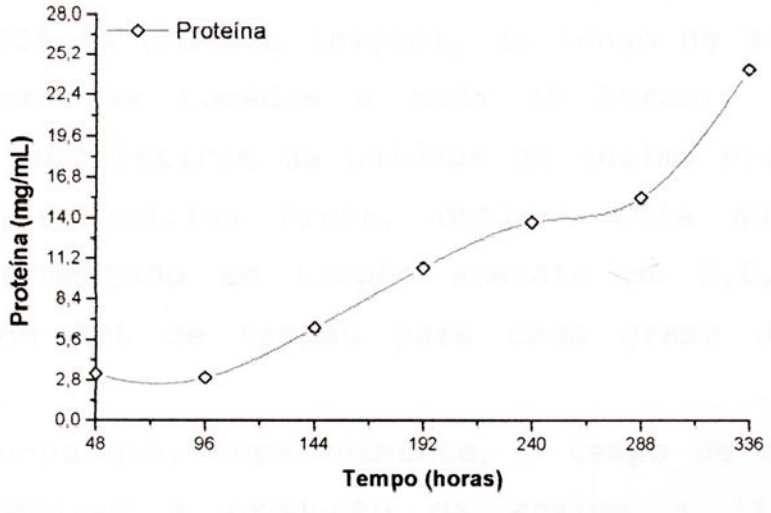


Figura 7: Teores de proteínas presentes no substrato fermentado pelo *P. viridicatum RFC3*.

3. Produção das enzimas (análise estatística)

As enzimas produzidas, pelo fungo *P. viridicatum RFC3* em fermentação em diferentes biorreatores (erlenmeyers e embalagens de polipropileno), foram analisadas estatísticamente quanto à influência dos fatores estudados: umidades de 70 e 80% e tempo de fermentação de 48 a 336 horas.

3.1. Exo-PG

3.1.1. Fermentação em erlenmeyers

Foram feitas as análises estatísticas da produção da Exo-PG obtida pelo cultivo do fungo em erlenmeyers, utilizando substrato (farelo de trigo + bagaço de laranja) com 70 ou 80% de umidade inicial, ao longo de 336 horas de cultivo (amostras tomadas a cada 48 horas). Os valores utilizados, consistiram da unidade de enzima por mililitro de solução enzimática bruta, obtidos pela suspensão do material fermentado em tampão acetato pH 5,0, 10mM, na proporção de 8mL de tampão para cada grama de material fermentado.

Observou-se que, separadamente, o tempo de cultivo e a umidade afetaram a produção da enzima a 1% e 5% de probabilidade respectivamente, segundo o teste F. Quando esses fatores interagem entre si, a análise estatística mostrou uma diferença significativa, a 5% de probabilidade, na produção da enzima. A média geral do ensaio foi de 6,2071 U/mL, o desvio foi de 3,6721U/mL e o coeficiente de variação foi de 59,1592 U/mL (Tabela 16).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 16: Análise de variância da atividade da Exo-PG produzida em erlenmeyers.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Umidade (U)	1	63,6402	63,6402	4,71*
Tempo (T)	6	581,8895	96,9816	7,19**
Fator U x T	6	284,6381	47,4397	3,51*
(Tratamentos)	13	930,1679	71,5514	-
Resíduo	28	377,5600	13,48,43	-
Total	41	1307,7279	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Foram aplicados os testes de Tukey para os fatores "umidade" e "tempo de cultivo". Os testes revelaram que a umidade a 80% favoreceu a produção da enzima, apresentando uma média de produção de 7,43 U/mL contra uma média de produção de 4,97 U/mL para a umidade de 70% (Tabela 17).

Tabela 17: Teste de Tukey para as médias das umidades utilizadas nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.

Umidade (%)	**Δ**	**Média**
80	2,3227	$7,4381^{A}$
70	2,3227	$4,9762^{B}$

Para os tempos de cultivo, também foram aplicados os testes de Tukey, que revelaram que a maior média de produção da enzima foi a 336 horas de cultivo, com 12,5167 U/mL e que a produção média da enzima aumenta com o aumento do tempo de fermentação (Tabela 18).

Tabela 18: Teste de Tukey para as médias dos tempos de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.

Tempo Cultivo (horas)	**Δ**	**Média**
336	6,7204	12,5167^{A}
288	6,7204	10,4500^{A}
192	6,7204	6,3000^{AB}
240	6,7204	6,2333^{AB}
144	6,7204	3,3167^{B}
96	6,7204	2,8333^{B}
48	6,7204	1,8000^{B}

Como a interação entre os fatores umidade do substrato e tempo de cultivo apresentou diferença significativa, foram feitos os desdobramentos e aplicação do teste F para saber onde essa diferença foi maior. Observou-se que em umidade a 80% (diferença significativa a 1% de probabilidade) a produção da Exo-PG, foi dependente também do tempo de cultivo o que não ocorreu a 70% (Tabela 19).

Tabela 19: Desdobramentos da Temperatura (T) dentro das Umidades (U) para a Exo-PG produzida.

Causas de Variação	***G.L.***	***S.Q.***	***Q.M.***	***F***
T x U (70%)	6	43,3914	7,2319	0,53^{NS}
T x U (80%)	6	823,1362	137,1894	10,17**
Total	(12)	(866,5276)	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

3.1.2. Fermentação em embalagens de polipropileno

Foram feitas também as análises estatísticas da produção da Exo-PG cultivada em embalagens de polipropileno a diferentes umidades (70 e 80%), ao longo de 336 horas de cultivo (amostras tomadas a cada 48 horas).

Observou-se que, separadamente, apenas o tempo de cultivo afetou a produção da enzima (a 1% de probabilidade), segundo o teste F. A análise estatística mostrou ainda que a interação umidade x tempo de cultivo também não foi capaz de produzir uma diferença significativa (a 5% de probabilidade), na produção da enzima. A média geral do ensaio foi de 4,1262 U/mL, o desvio foi de 3,4598 U/mL e o coeficiente de variação foi de 83,8498 U/mL (Tabela 20).

Tabela 20: Análise de variância da atividade da Exo-PG produzida em embalagens de polipropileno.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Umidade (U)	1	1,1336	1,1336	$0,09^{NS}$
Tempo (T)	6	380,8862	63,4810	$5,3032^{**}$
Fator U x T	6	59,7348	9,9558	$0,8317^{NS}$
(Tratamentos)	13	441,7545	33,9811	-
Resíduo	28	335,1667	11,9702	-
Total	41		-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Foram aplicados os testes de Tukey para os fatores "tempo de cultivo" e "umidade" apesar deste ultimo não ter sido significativo pelo teste F. O teste revelou que a umidade a 80% favoreceu a produção da enzima em relação à umidade de 70%, apresentando uma média de produção de

4,2905 U/mL ligeiramente maior que uma média de produção de 3,9619 U/mL obtida a 70% (Tabela 21).

Tabela 21: Teste de Tukey para as médias das umidades utilizadas nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.

Umidade (%)	Δ	Média
80	2,1884	4,2905^{A}
70	2,1884	3,9619^{A}

Para o fator tempo de cultivo, também foi aplicado o teste de Tukey que revelou que a maior média de produção da enzima foi a 336 horas de cultivo, com 9,25 U/mL, e que a produção média da enzima aumenta com o aumento do tempo de fermentação (Tabela 22).

Tabela 22: Teste de Tukey para as médias dos tempos de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
336	6,3319	9,2500 ^{A}
288	6,3319	7,4667^{AB}
240	6,3319	4,3333^{ABC}
192	6,3319	4,2833^{ABC}
48	6,3319	1,2833^{BC}
144	6,3319	1,1833^{BC}
96	6,3319	1,0833^{C}

Pelos resultados apresentados nos dois biorreatores, observa-se que o fungo *P. viridicatum RFC3* tem uma melhor resposta para a produção da Exo-PG quando cultivado em erlenmeyers com substrato hidratado a 80% de umidade e por um período de 336 horas. O mesmo resultado foi observado

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

quando foi usada a embalagem de polipropileno. Entretanto, a produção de Exo-PG no erlenmeyer, quando o substrato é hidratado a 80% e em 336h, é o dobro daquela obtida em embalagem de polipropileno (Figura 8 e 9).

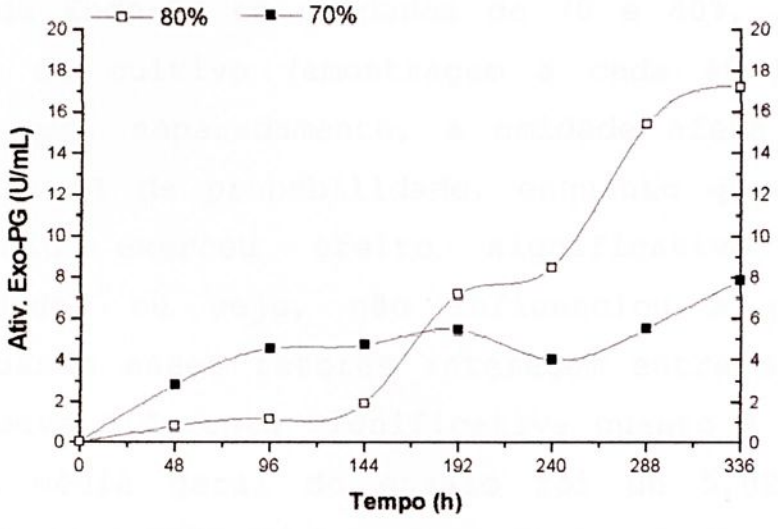


Figura 8: Produção média da Exo-PG cultivada em erlenmeyers a 70% (■) e 80% (□) de umidade.

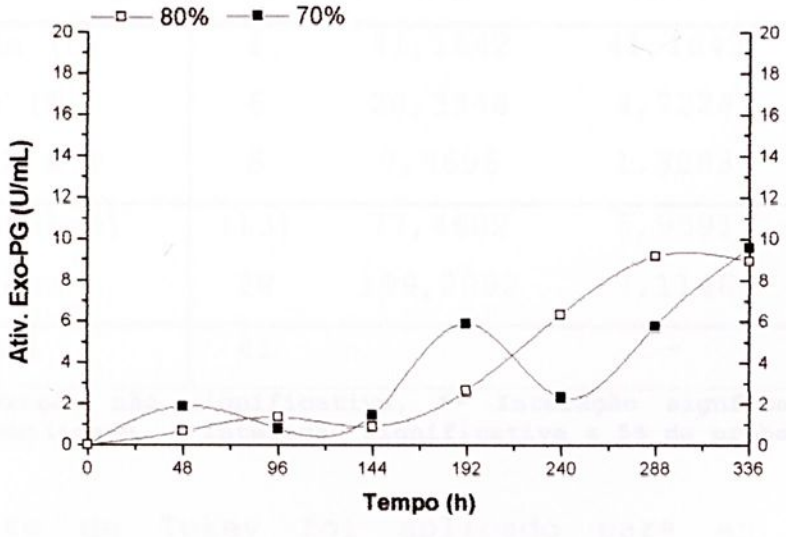


Figura 9: Produção média da Exo-PG cultivada em embalagens de polipropileno a 70% (■) e 80% (□) de umidade.

3.2. Produção de Endo-PG

3.2.1. Fermentação em erlenmeyers

Foram feitas também as análises estatísticas da produção da Endo-PG em umidades de 70 e 80%, ao longo de 336 horas de cultivo (amostragem a cada 48 horas). Foi observado que, separadamente, a umidade afeta a produção da enzima a 5% de probabilidade, enquanto que o tempo de cultivo não exerceu efeito significativo a 5% de probabilidade, ou seja, não influenciou a produção da enzima. Quando esses fatores interagem entre si, notou-se que não houve diferença significativa quanto à produção da enzima. A média geral do ensaio foi de 5,0205 U/mL, o desvio foi de 2,6673 U/mL e o coeficiente de variação foi de 53,1289 U/mL (Tabela 23).

Tabela 23: Análise de variância da atividade da Endo-PG produzida em erlenmeyers.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Umidade (U)	1	41,1642	41,1642	$5,78^{*}$
Tempo (T)	6	28,3344	4,7224	$0,66^{NS}$
Fator U x T	6	7,9696	1,3283	$0,18^{NS}$
(Tratamentos)	(13)	77,4682	5,9591	-
Resíduo	28	199,2092	7,1146	-
Total	41		-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey foi aplicado para as médias das umidades de 70 e 80%, as quais foram a única causa de variação da produção da enzima. A tabela 24 mostra que a

melhor produção média da Endo-PG ocorreu em meio com 70% de umidade (6,01 U/mL), a qual foi significativamente maior que média obtida a 80% de umidade (4,03 U/mL).

Tabela 24: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação à umidade do substrato.

Umidade (%)	**Δ**	**Média**
70	1,6871	6,0105[A]
80	1,6871	4,0305[B]

Porém, para fins comparativos também foram feitos os testes de Tukey para o fator tempo de cultivo, apesar de não apresentarem uma diferença significativa entre si pelo teste F. Este teste indicou que a apesar da maior média ser obtida a 192 horas (5,91 U/mL), a produção da Endo-PG aumenta lentamente até 336 horas embora não tenha sido detectada diferença significativa entre as médias (Tabela 25).

Pelos dados observa-se que, em substrato composto de bagaço de laranja e farelo de trigo, a maior produção ocorreu quando o teor de umidade do mesmo foi de 70%, num período de 336 horas.

unesp

Tabela 25: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Endo-PG em relação ao tempo de cultivo.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
192	4,8815	5,9117[A]
336	4,8815	5,8750[A]
240	4,8815	5,5517[A]
288	4,8815	5,4783[A]
144	4,8815	4,4850[A]
96	4,8815	3,9433[A]
48	4,8815	3,8983[A]

3.2.1. Fermentação em embalagens de polipropileno

Foram feitas também as análises estatísticas da produção da endo-PG em embalagens de polipropileno usando substratos com umidades de 70 e 80%, ao longo de 336 horas de cultivo (amostragem a cada 48 horas). Foi observado que, separadamente, nenhum dos fatores apresentou diferença significativa a 5% de probabilidade, ou seja, não influenciaram a produção da enzima Endo-PG. Quando esses fatores interagem entre si notou-se novamente que não houve diferença significativa quanto à produção da enzima. A média geral do ensaio foi de 4,3167 U/mL, o desvio foi de 2,4673 U/mL e o coeficiente de variação foi de 57,1578 U/mL (Tabela 26).

Tabela 26: Quadro de análise de variância da atividade da Endo-PG.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Umidade (U)	1	16,9736	16,9736	$2,78^{NS}$
Tempo (T)	6	59,8500	9,9750	$1,63^{NS}$
Fator U x T	6	9,0414	1,5069	$0,24^{NS}$
(Tratamentos)	(13)	85,8650	6,6050	-
Resíduo	28	170,4533	6,0876	-
Total	41		-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Apesar de não existirem influências significativas dos fatores dentro da fermentação em embalagens de polipropileno, o teste de Tukey foi aplicado para as médias das umidades de 70 e 80%, e para o tempo de cultivo. A tabela 27 mostra que a maior produção média da Endo-PG ocorreu em meio com 70% de umidade (4,95 U/mL), embora sem diferença estatisticamente significativa daquela obtida a 80% de umidade (3,68 U/mL). Esses resultados corroboram aqueles obtidos para a Exo-PG, nos quais a umidade interferiu sigificativamente na produção da enzima em erlenmeyer mas não em embalagem de polipropileno. A análise visual do material fermentado ao longo das 336 horas, nos permite inferir que o erlenmeyer permitiu maior perda de umidade que a embalagem de polipropileno e possivelmente em função disso, não tenha sido detectada a influência significativa do teor de umidade sobre a produção das enzimas, quando esta última embalagem foi usada.

Tabela 27: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação à umidade do substrato.

Umidade (%)	Δ	Média
70	1,5606	4,9524[A]
80	1,5606	3,6810[A]

Embora o teste de Tukey aplicado para o fator tempo de cultivo não tenha apresentado diferença significativa entre si, observa-se que a máxima produção da enzima ocorreu em 336 horas. A produção da endo-PG aumentou lentamente até o 14° dia de fermentação (Tabela 28).

Pelos dados conclui-se que, para se obter uma boa produção de Endo-PG deve-se utilizar o substrato hidratado a 70% de umidade por um período de 336 horas.

Tabela 28: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas em relação ao tempo de cultivo.

Tempo Cultivo (horas)	Δ	Média
336	4,5155	5,4667[A]
240	4,5155	5,3833[A]
288	4,5155	5,1167[A]
192	4,5155	4,8167[A]
144	4,5155	4,0167[A]
96	4,5155	3,5333[A]
48	4,5155	1,8833[A]

Pelos resultados apresentados nos dois biorreatores, observa-se que o fungo *P. viridicatum RFC3* tem uma melhor resposta para a produção da Endo-PG quando cultivado em erlenmeyers com substrato hidratado a 70% de umidade e por um período de 336 horas (Figura 10 e 11).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

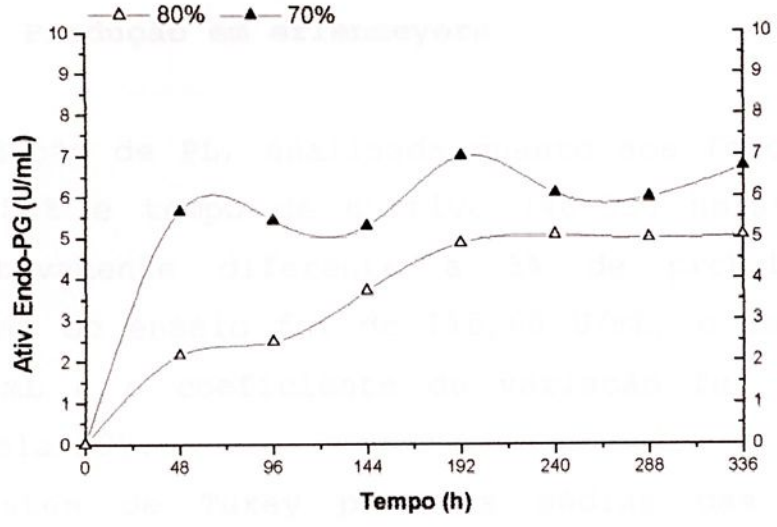


Figura 10: Produção média da Exo-PG cultivada em erlenmeyers a 70% (▲) e 80% (△) de umidade.

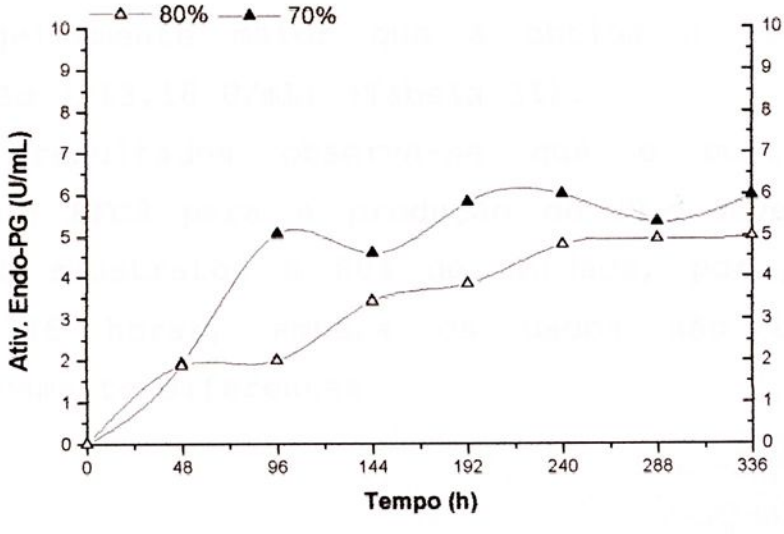


Figura 11: Produção média da Exo-PG cultivada em embalagens de polipropileno a 70% (▲) e 80% (△) de umidade.

3.3. PL

3.3.1. Produção em erlenmeyers

A produção de PL, analisada quanto aos fatores umidade de 70 e 80% e tempo de cultivo (48-336 horas), não foi significativamente diferente a 5% de probabilidade. A média geral do ensaio foi de 118,60 U/mL, o desvio foi de 175,16 U/mL e o coeficiente de variação foi de 147,6887 U/mL (Tabela 29).

Os testes de Tukey para as médias das umidades e tempos de cultivo indicaram que, a 80% de umidade, houve uma maior produção da enzima (129,23 U/mL), porém, não significativa quando comparada com a hidratação a 70% (107,9762 U/mL) (Tabela 30).

A análise do fator tempo de cultivo indicou uma maior produção média em 240 horas de cultivo com 234,28 U/mL, sendo ligeiramente maior que a obtida a 336 horas de fermentação (213,18 U/mL) (Tabela 31).

Pelos resultados observa-se que o cultivo de *P. viridicatum RFC3* para a produção de PL, deve ser feito utilizando substratos a 80% de umidade, por períodos de 240 ou 336 horas, embora os dados não tenham sido estatisticamente diferentes.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 29: Quadro de análise de variância da atividade da PL (PL) em erlenmeyers.

Causas de Variação	***G.L.***	***S.Q.***	***Q.M.***	***F***
Umidade (U)	1	4744,5973	4744,5943	$0,15^{NS}$
Tempo (T)	6	248367,8790	41394,6465	$1,35^{NS}$
Fator U x T	6	60924,9124	10154,1521	$0,33^{NS}$
(Tratamentos)	(13)	314037,3857	24156,7220	-
Resíduo	28	859126,0533	30683,0733	-
Total	41		-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 30: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Pl em relação à umidade do substrato.

Umidade (%)	**Δ**	**Média**
80	110,7959	$129,2333^{A}$
70	110,7959	$107,9762^{A}$

Tabela 31: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da PL em relação ao tempo de cultivo.

Tempo Cultivo (horas)	**Δ**	**Média**
240	320,5743	$234,2833^{A}$
336	320,5743	$213,1833^{A}$
144	320,5743	$133,8333^{A}$
288	320,5743	$121,7833^{A}$
96	320,5743	$71,3333^{A}$
48	320,5743	$36,2667^{A}$
192	320,5743	$19,5500^{A}$

3.3.2. Produção em embalagens de polipropileno

A produção de PL em embalagens de polipropileno foi analisada quanto aos fatores, umidades de 70 e 80% e tempo de cultivo (48-336 horas). Assim como no erlenmeyers, o efeito dos fatores estudados sobre a produção da enzima, não foram estatisticamente significativos a 5% de probabilidade. A média geral do ensaio foi de 93,67 U/mL, o desvio foi de 148,51 U/mL e o coeficiente de variação foi de 158,53 U/mL (Tabela 32).

Os testes de Tukey para as médias das umidades e tempos de cultivo indicaram que, a 70% de umidade, houve uma maior produção da enzima (101,48 U/mL), porém, não significativa quando comparada com a hidratação a 80% (85,86 U/mL) (Tabela 33).

A análise do fator tempo de cultivo indicou uma maior produção média em 336 horas de cultivo com 188,83 U/mL (Tabela 34).

Pelos resultados observa-se que o cultivo de *P. viridicatum RFC3*, para a produção de PL deve ser feito utilizando substratos a 70% de umidade, por períodos de 336 horas, embora os dados não tenham sido estatisticamente diferentes.

unesp

Tabela 32: Análise de variância da atividade da PL (PL) produzida em embalagens de polipropileno.

Causas de Variação	***G.L.***	***S.Q.***	***Q.M.***	***F***
Umidade (U)	1	2561,5238	2561,5238	$0,11^{NS}$
Tempo (T)	6	120029,4229	20004,9038	$0,90^{NS}$
Fator U x T	6	69164,8095	11527,4683	$0,52^{NS}$
(Tratamentos)	(13)	191755,7562	14750,4428	-
Resíduo	28	617556,6200	22055,5936	-
Total	41		-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 33: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da Pl em relação à umidade do substrato.

Umidade (%)	**Δ**	**Média**
70	93,9364	$101,4857^{A}$
80	93,9364	$85,8667^{A}$

Tabela 34: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas da PL em relação ao Tempo de cultivo.

Tempo Cultivo (horas)	**Δ**	**Média**
336	271,7932	$188,8333^{A}$
288	271,7932	$151,8333^{A}$
144	271,7932	$88,3333^{A}$
48	271,7932	$81,7333^{A}$
192	271,7932	$76,6667^{A}$
96	271,7932	$37,6667^{A}$
240	271,7932	$30,6667^{A}$

Pelos resultados apresentados nos dois biorreatores, observa-se que o fungo *P. viridicatum RFC3* apresenta uma melhor resposta para a produção da PL quando cultivado em erlenmeyers com substrato hidratado a 70% de umidade e por um período de 336 horas.

Para a produção média da enzima o biorreator utilizado apresentou características distintas para a umidade inicial. Os erlenmeyers com o substrato a 80% de umidade e a embalagem de polipropileno com 70% obtiveram uma maior produção da enzima praticamente nos mesmos tempos de cultivo (48, 144 e 240 horas) (Figura 12 e 13).

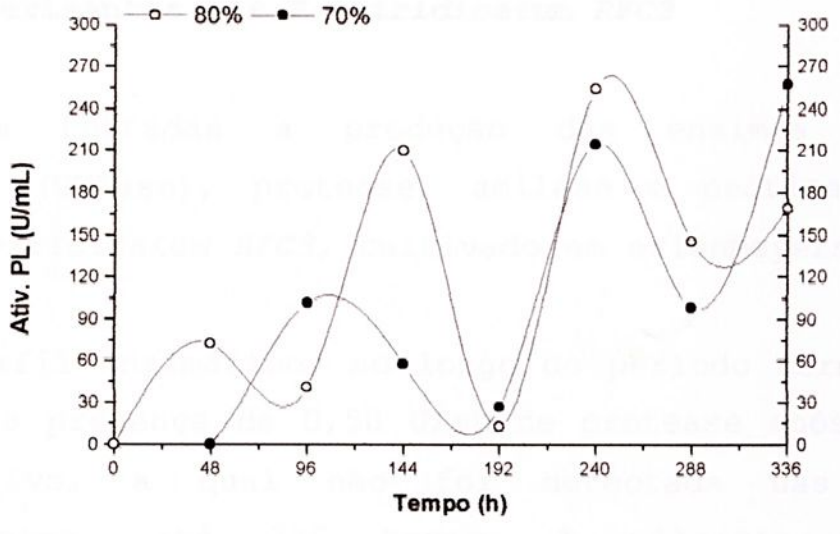


Figura 12: Produção média da Exo-PG cultivada em erlenmeyers a 70% (●) e 80% (○) de umidade.

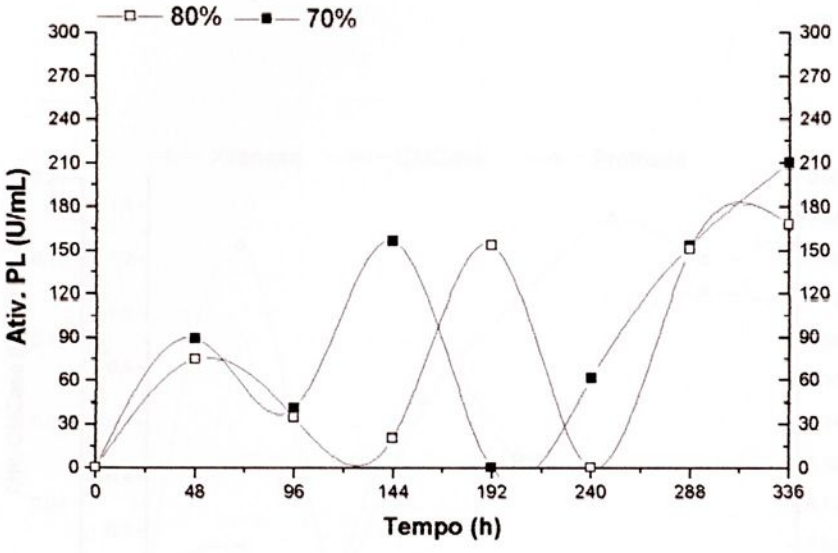


Figura 13: Produção média da Exo-PG cultivada em embalagens de polipropileno a 70% (●) e 80% (○) de umidade.

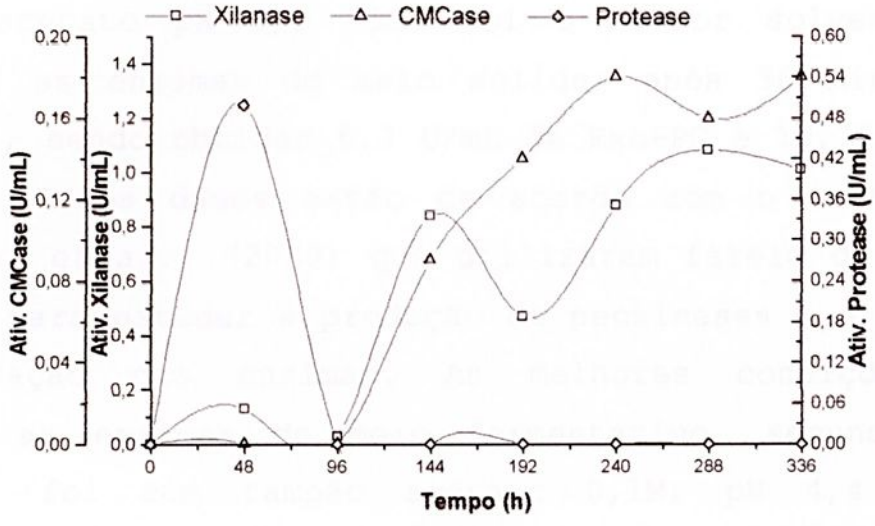
4. Estudo da produção de outras enzimas despolimerizantes por *P. viridicatum RFC3*

Foram testadas a produção das enzimas xilanase, celulase (CMCase), protease, amilase e pectina esterase por *P. viridicatum RFC3*, cultivado em erlenmeyers a 80% de umidade.

O perfil enzimático, ao longo do período fermentativo, revelou a presença de 0,50 U/mL de protease após 48 horas de cultivo, a qual não foi detectada nas amostras subseqüentes, até 336 horas. A xilanase e CMCase apresentaram o pico de produção a 288 e 336 horas de cultivo com 1,08 U/mL e 0,18 U/mL, respectivamente (Figura 15A).

A amilase produzida apresentou pico a 288 horas de fermentação com 0,14 (U/mL) enquanto que a Pectina esterase produzida em 192 horas foi de 1,5 U/mL (Figura 15B).

A



B

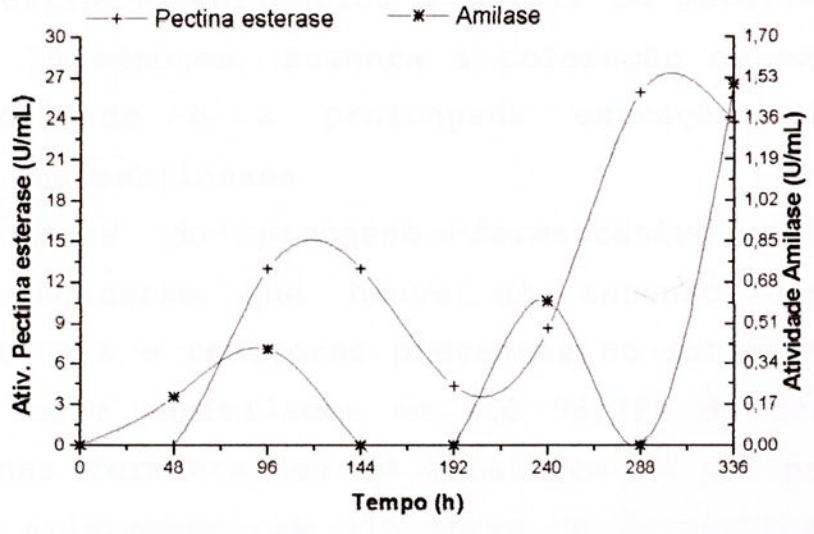


Figura 14: Produção das enzimas despolimerizantes por *P. viridicatum RFC3* no substrato a 80% de umidade.
A: Xilanase (□), Protease (◇) e CMCase (△).
B: Amilase (*), Pectina Esterase (+)

5. DISCUSSÃO

Os ensaios para a extração da enzima revelaram que o tampão acetato pH 5,0 10mM foi o melhor solvente para lixiviar as enzimas do meio sólido; após 30 minutos de agitação, sendo obtidas 6,3 U/mL de Exo-PG e 10,35 U/mL de Endo-PG. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Castilho, *et al.*, (2000) que utilizaram farelo de trigo e de soja para estudar a produção de pectinases e a cinética de extração das enzimas. As melhores condições para remover as enzimas do meio fermentativo, segundo esses autores, foi com tampão acetato 0,1M, pH 4,4 por 30 minutos a 35°C, sendo recuperados 20 U/mL de PG, mesmo com um baixo poder tamponante da solução utilizada como tampão. Além disso, Sing *et al.* (1999) reportaram que o tempo de extração enzimática a partir do material de FSS, maior que 15 minutos, aumenta a coloração do extrato e a sua viscosidade e a prolongada extração diminuiu a atividade das pectinases

Os dados do processo fermentativo do presente trabalho indicaram que houve um intenso consumo dos açúcares totais e redutores presentes no substrato sólido, os quais foram assimilados em até 96,28% da concentração inicial, nas fermentações em embalagem de polipropileno e 91,08% em erlenmeyer, em 336 horas de fermentação. Sato e Sudo (1999) reportam que o consumo dos açúcares prontamente assimiláveis do meio, promove um melhor crescimento fúngico e grande sucesso na colonização do meio fermentativo. Entretanto, a redução desses açúcares do meio é importante para se evitar a repressão catabólica e iniciar a produção das enzimas despolimerizantes (SOLÍS-PEREIRA *et al.*, 1993; ACUÑA-ARGÜLLES *et al.*, 1995; HANG e

WOODAMS, 1994). Solís-Pereira *et al.* (1993) ainda reportaram que a presença de glicose no meio reprimiu a produção de pectinases, enquanto que açúcares como galacturonatos estimularam a produção dessas enzimas pelo *Aspergillus niger CH4* em FSS cujo meio era constituído por cana-de-açúcar como substrato inerte e suplementado com nutrientes como sulfato de amônio e de magnésio, pectina e açúcares

O tempo de fermentação mostrou-se importante para a produção das enzimas no farelo de trigo combinado com o bagaço de laranja nos diferentes biorreatores. O aumento da produção de pectinases foi mais acentuado após 240 horas de cultivo (10 dias), corroborando os dados de outros processos fermentativos semi-sólidos como o descrito em ensaios com *Aspergillus niger* em bagaço de cana e casca de laranja, visando a produção de pectinases, nos quais o pico de produção da enzima ocorreu após 15 dias de fermentação (ACUÑA-ARGÜELLES *et al*, 1995; RIZZATTO, 1999).

A umidade do substrato também se mostrou um fator de grande variação. Hours *et al.*(1988) indicaram que a umidade do substrato entre 80 e 90% foi ideal para a produção de pectinases pelo *Aspergillus foetidus* em polpa de maçã. Porém, a Endo-PG estudada no presente ensaio apresentou uma condição melhor de produção na umidade de 70%, assim como Xia e Cen (1999) para as enzimas produzidas em substratos de milho e trigo.

Quanto ao biorreator utilizado, o Erlenmeyer foi mais adequado para produção das enzimas comparado com a embalagem de polipropileno. Entretanto, Rizzatto (1999) demonstrou que este tipo de embalagem favorecia a produção

de pectina por *P. italicum*, obtendo 15,1 U/g de PG em meio composto de bagaço de laranja.

No meio fermentativo foram obtidas, além das pectinases, outras enzimas como celulase, xilanase, protease, pectinaesterase e amilase cujos ensaios mostraram uma produção de 32,32 U/mL, 153,07 U/mL, 0,5 U/mL, 1,50 U/mL e 25,86 U/mL, respectivamente. A produção de um "pool" de enzimas despolimerizantes pelo microrganismo é importante para que este possa degradar substratos complexos e sustentar seu crescimento em ausência de açúcares prontamente assimiláveis. Microrganismos capazes de produzir uma grande quantidade de enzimas naturalmente e sem manipulação genética, tem um grande potencial biotecnológico a ser explorado. Preparados enzimáticos que vêm sendo produzidos por varias indústrias como a NOVO-Nordisk, Röhn, Biocon..., a partir de várias espécies de *Aspergillus*, geralmente são misturas de enzimas que são aplicadas tanto na industria de alimentos quanto na industria de celulose e papel visando diminuir custos de processamento, aumentar o rendimento do produto final e diminuir a liberação de resíduos tóxicos no ambiente (PILNIK e VORAGEN, 1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

6. CONCLUSÕES

- O Biorreator mais eficiente para o processo fermentativo estudado foi o erlenmeyer quando comparado com a embalagem de polipropileno.
- A umidade a 80% favoreceu a produção de Exo-PG e PL, entretanto, a produção de Endo-PG foi maior no substrato com 70% de umidade.
- O fungo foi capaz de produzir outras enzimas como xilanase, celulase, amilase, protease e pectina esterase ao longo do processo fermentativo.

VIII - CAPITULO III: SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PECTINASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Penicillium viridicatum RFC3*

1. INTRODUÇÃO

A purificação e caracterização individual das enzimas levam a um melhor entendimento de suas propriedades, além de facilitar o conhecimento de suas especificidades pelos substratos. Do ponto de vista da aplicação, a enzima pura é requerida principalmente, quando utilizada como componente de medicamentos. Nos últimos anos tem aumentado os esforços associados a técnicas de purificação de proteínas obtidas nos processos fermentativos (COELHO *et al.*, 1995).

As pectinases produzidas podem ser classificadas de acordo com o modo de atuação na molécula de pectina podendo ser subdividida em: **Poligalacturonases** (Poly-α-1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.15): Hidrolisam de forma randômica as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização da molécula.

Exo-PG: Este grupo é subdividido, em **Exo-PG-1** (Exo-poly-α-1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.67) que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e **Exo-PG-2** (Exo-poly-α-1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.82) que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora,

liberando ácidos digalacturônicos livres. **Pectina-liases** (Poly-α-1,4-D-methoxygalacturonide lyase, EC 4.2.2.10): São enzimas despolimerizantes e quebram a ligação glicosídica por mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio a partir da ligação entre os carbonos da posição 4 e 5 do ácido galacturônico. Sua ação é acompanhada por um aumento da absorbância a 235nm devido à formação de dupla ligação, entre aqueles carbonos, que serve para monitorar a atividade enzimática. Esta enzima apresenta preferência por pectinas de alta metoxilação.

Segundo Whitaker (1990) a existência da fração polimetilgalacturonato é questionada, uma vez que nenhum autor foi capaz de demonstrar a presença desta enzima, quando poligalacturonato 100% metilado foi usado como substrato na ausência de PMGE e Endo-PGL. Segundo ele, a maioria dos relatos da literatura não são conclusivos em relação à caracterização das diversas frações pectinolíticas, principalmente as referentes à fração PMG. A existência desta fração também foi questionada por Macmillan e Sheiman (1974), que basearam-se no fato de que o mecanismo de quebra da cadeia por trans-eliminação fôra descoberto somente em 1960, o que tornaria óbvio que estudos descrevendo PMG anteriormente a esta data, na realidade descreviam, pelo menos na sua maior parte, a fração PMGL.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Separar as frações de PG e PL após 336 horas de fermentação.
- Caracterizar físico-quimicamente as frações das enzimas separadas por cromatografia.
- Testar a especificidade das frações separadas em relação ao substrato.

3. MATERIAIS E MÉTODO

1-Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *P. viridicatum RFC3*.

2-Meios de cultivo

Foram utilizados os meios de manutenção e de estudo para produção da enzima, conforme descrito nos itens 2.1 e 2 dos capítulos I e II respectivamente.

3-Produção da enzima em fermentação semi-sólida.

A fermentação semi-sólida para a produção das pectinases ocorreu em erlenmeyers de 250 mL contendo 10g da mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja(1:1). Após a hidratação, a 80% de umidade, com solução nutriente (item 2.2 - cap. 1), o material foi inoculado com 10^7 esporos por grama e incubado em estufa a 28 °C.

4-Quantificação de proteínas

Foram feitos testes para quantificação de proteínas em erlenmeyers a 80% de umidade, ao longo do período fermentativo, segundo o método descrito por Bradford, (1976).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

5-Medida da atividade enzimática

As atividades da Exo-PG, Endo-PG e PL foram avaliadas conforme descrito nos itens 6.1, 6.2 e 6.3, citadas anteriormente no capítulo II.

6-Separação das frações enzimáticas

6.1. Concentração da solução enzimática bruta

A solução enzimática bruta foi obtida a partir da suspensão do material fermentado, após 336 horas de cultivo, em tampão acetato (10mM, pH 5,0) numa proporção de 8 mL/g de substrato fermentado. Após agitação a 100rpm por 30 minutos, o material foi filtrado e depois centrifugado, constituindo-se no extrato bruto.

As enzimas foram testadas quanto à sua estabilidade em relação ao congelamento em freezer (-20°C) e em N_2 líquido. O extrato bruto, congelado pelos dois métodos, foi liofilizado até uma concentração de 10% do volume inicial. A solução enzimática resultante foi dialisada (tampão Tris/HCl 10mM) e foram dosadas as atividades da PG (endo e exo) e PL

As proteínas presentes na solução enzimática bruta, obtida após a filtração inicial do material, também foram precipitadas com etanol gelado (-20°C) (para fins de comparação com o processo de liofolização), numa proporção de 3:1 por 2 horas. Após esse período, o material precipitado foi centrifugado a 23000xg por 15 minutos a 10°C. O precipitado obtido, foi ressuspendido em 35 mL de tampão Tris-HCl 50mM pH7,4 e teve dosadas as atividades da PG (endo e exo) e PL.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

6.2. Separação das frações por filtração em gel sephadex G-50

Após avaliação do melhor método de precipitação das enzimas, foi escolhida a liofilização para concentrar as proteínas. Um volume de 20 mL de enzima liofilizada e ressuspendida em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 foi aplicado em coluna cromatografica com Sephadex-G50 (100x3 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão por 24 horas. A eluição ocorreu com tampão Tris-HCl pH 7,4 num fluxo de 0,4 mL/min coletando-se frações de 6 mL. Foi medida a atividade das PGs (endo e exo) e PL nas frações coletadas sendo juntados os conteúdos dos tubos cujas amostras apresentaram atividade das PGs ou de PL.

7. Caracterização físico-química das pectinases

As frações das enzimas endo e Exo-PG e PL obtidas pelo processo de separação cromatográfica foram caracterizadas, conforme descrito a seguir:

7.1. Determinação do pH e temperatura ótimos

O comportamento da atividade das enzimas em função do pH foi estudado incubando-se a fração correspondente em substrato com tampões acetato (pH 3,0 - 5,5), citrato/NaOH (pH 5,5 - 7,0), Tris/HCl (pH 7,0 - 8,5) e glicina/NaOH (pH 8,5 - 10,5).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 30 a 70°C, no pH ótimo.

7.2. Determinação da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH

As frações enzimáticas de Exo-PG e PL foram mantidas por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 10 a 70°C. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

A estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se as enzimas em tampões com pH variando de 3,0 a 10,0 em ausência de substrato, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperaturas ótimos.

8. Testes de especificidade pelo substrato

Para os testes de especificidade das enzimas foram seguidos os mesmos procedimentos descritos nos itens 6.1, 6.2 e 6.3, variando-se apenas os substratos, os quais constaram de: pectina cítrica de baixa esterificação (26%), pectina cítrica altamente esterificada (86%), ácido poligalacturônico, pectina de maçã obtidos da Sigma. Também foi testada a pectina comercial (Braspectina) de alta metoxilação.

unesp

9. Efeito de íons na atividade enzimática.

Foram testados os efeitos dos íons cálcio, prata, magnésio, manganês, zinco, potássio e mercúrio sob a forma de sulfatos, além de EDTA e $CaCl_2$ sobre a atividade das frações de PG (exo e endo) e PL coletadas. Os íons foram testados a uma concentração de 10mM na mistura de reação.

10. Análise dos produtos da reação

Após a incubação da pectina cítrica com a solução enzimática bruta (reação enzimática) por 10 minutos foram analisados os açúcares ácidos liberados através de cromatografia de papel.

Amostras de 5 a 6 µL dos padrões (ácido galacturônico, digalacturônico, trigalacturônico e poligalacturônico) e 35 a 60 µL do hidrolisado enzimático (enzima bruta e frações separadas) foram analisadas através de cromatografia de papel (Whatman n°1) com corrida descendente por 24 horas. Foi utilizado como solvente uma mistura de n-butanol/ácido acético/água, na proporção 5:3:2. Após a secagem do papel, procedeu-se a revelação imergindo-se o cromatograma em solução de nitrato de prata dissolvido em acetona, seguido de uma solução de 0,5N de NaOH e etanol e tiossulfato de sódio a 10%.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

4. RESULTADOS

1 - Separação das frações enzimáticas.

Após definidos os melhores tempos de cultivo (336 horas), biorreator (Erlenmeyer) e umidade (80%) para a produção de pectinases pelo fungo *P. viridicatum RFC3*, foi realizado uma fermentação nessas condições otimizadas e a partir da solução enzimática bruta obtida, foram separadas as frações enzimáticas (Endo e Exo-PG e PL) através de ensaios cromatográficos em gel sephadex G-50.

A solução enzimática bruta (Tabela 35), precipitada com etanol gelado (-20°C) e ressuspendida em tampão Tris/HCl pH 7,4, mostrou uma recuperação de 14,91 % para a Exo-PG, 15,20 % para a Endo-PG.

Foram testados, para os ensaios de congelamento, nitrogênio líquido e freezer a -20°C. O processo de congelamento em nitrogênio líquido mostrou-se mais eficiente que em freezer, para a PL resultando na detecção da atividade após o processo de congelamento, o que não ocorreu no congelamento em freezer. A recuperação da Endo-PG foi de 14,24% em freezer e 9,53% em nitrogênio líquido e para a Exo-PG, 14,24% em freezer e 15,47% em nitrogênio líquido. O extrato congelado em nitrogênio líquido foi usado para a liofolização. As atividades das enzimas recuperadas do material liofilizado foram de 30 U/mL (21,42%) para a Exo-PG, 18,27 U/mL (30,09%) para Endo-PG e 82,70 U/mL de PL. Após a diálise do material liofilizado, a recuperação das enzimas foram de 58,92 % para a Exo-PG e 13,08 % para a Endo-PG.

O aumento da atividade da maioria das enzimas após a diálise sugere que as mesmas poderiam estar sendo inibidas

unesp

por íons, os quais seriam removidos após o processo de diálise.

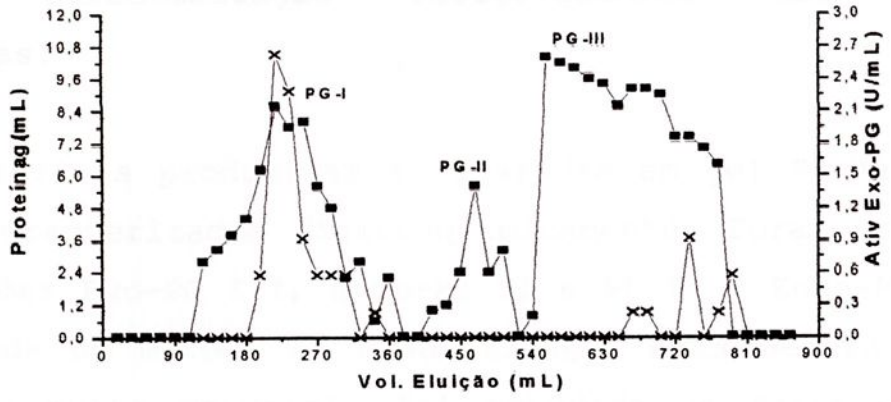
Um volume de 20mL do material liofilizado e ressuspendido em tampão Tris/HCl 50mM pH 7,4, foi aplicado em coluna Sephadex G-50, equilibrada e eluída com o mesmo tampão. As frações foram coletadas num volume de 6mL a cada 15 minutos (fluxo de 0,4 mL/min.) por 48 horas (990 mL). Como resultado do fracionamento foram observados 3 picos para a Exo-PG (Figura 15A), 4 picos para a Endo-PG (Figura 15B) e 4 picos para a PL (Figura 15C).

Tabela 35: Síntese do processo de purificação da PG (endo e exo) e PL em coluna Sephadex G-50 a partir da solução enzimática bruta obtida após 336 horas de cultivo em meio de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1).

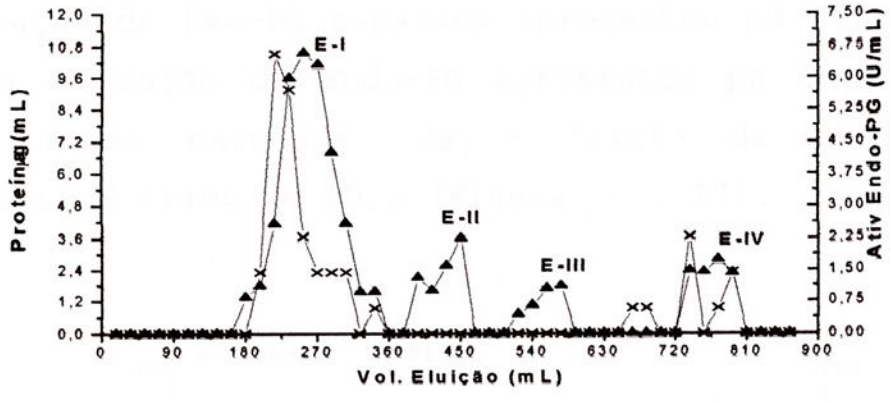
Etapa		*Volume (mL)*	*U/mL*	*U/Total*	*Ativ. Espec.*	*Rend. (100%)*
Enzima Bruta	*Exo-PG*	350	8,0	2800	23,80	100
	Endo-PG		3,47	1214,50	23,80	100
	PL		*	*	*	*
Precip. Etanol	*Exo-PG*	35	3,94	137,5	104,8	14,91
	Endo-PG		3,5	122,5	104,8	15,20
	PL		45,81	1603,35	*	ND
N_2 liq.	*Exo-PG*	100	2,67	267	16,8	9,53
	Endo-PG		1,88	188	16,8	15,47
	PL		38,1	3810	16,8	ND
diálise	*Exo-PG*	100	16,5	16500	52,6	58,92
	Endo-PG		15,89	1589	52,6	13,08
	PL		12,7	1270	52,6	ND
Liofilização	*Exo-PG*	100	2,45	245	77,8	8,75
	Endo-PG		1,8	180	77,8	14,82
	PL		151	15100	77,8	ND
Aplicados em G-50	*Exo-PG*	20	30	600	23,8	21,42
	Endo-PG		18,27	365,51	23,8	30,09
	PL		82,7	1654	23,8	ND

- **Para a atividade da PL não foi detectada a presença da enzima bruta. ND não determinada pela falta da atividade na solução enzimatica bruta**

A



B



C

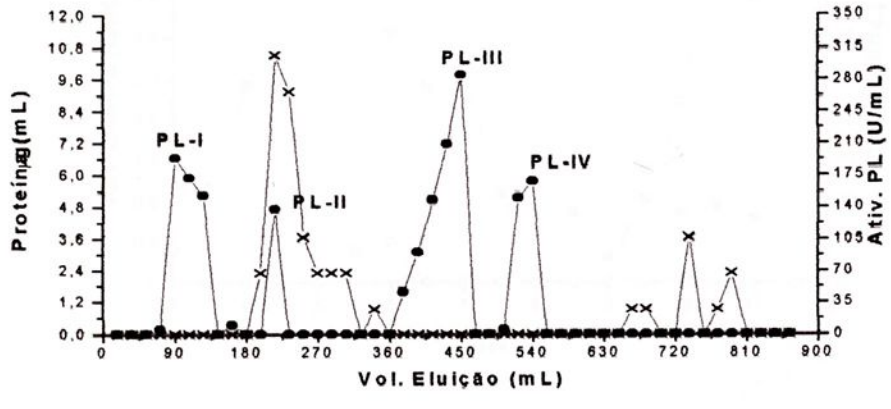


Figura 15: Separação das frações enzimáticas de EXO-PG em coluna de gel Sephadex G-50.
Proteína (*):
A: atividade da EXO-PG (■).
B: atividade da ENDO-PG (▲).
C: atividade da PL(●).

2. Caracterização Físico-química das frações coletadas.

As enzimas produzidas e separadas em gel Sephadex G-50 foram caracterizadas físico-quimicamente. Foram utilizadas as frações Exo-PG III, Endo-PG II e PL I. A Endo-PG por se tratar de um método de quantificação mais demorado e por utilizar muito material, foi estudada na faixa da pH de 5,5 a 7,0.

A fração da Exo-PG separada apresentou pH ótimo de 5,0 enquanto a fração da Endo-PG apresentou pH ótimo de 6,5 para a faixa estudada. Já a fração da PL separada apresentou pH ótimo de 10,5 (Figura 16 e 17).

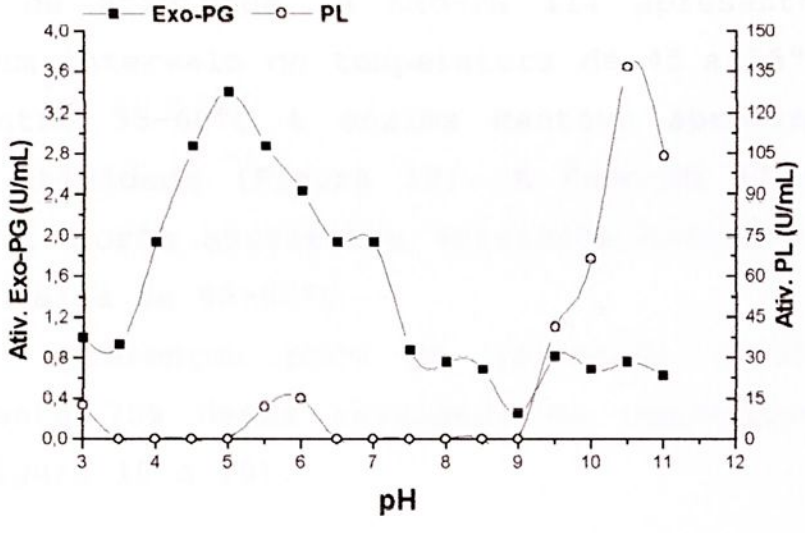


Figura 16: Efeito do pH sobre a atividade da fração correspondente da Exo-PG (■) e PL (○) separada em Sephadex G-50.

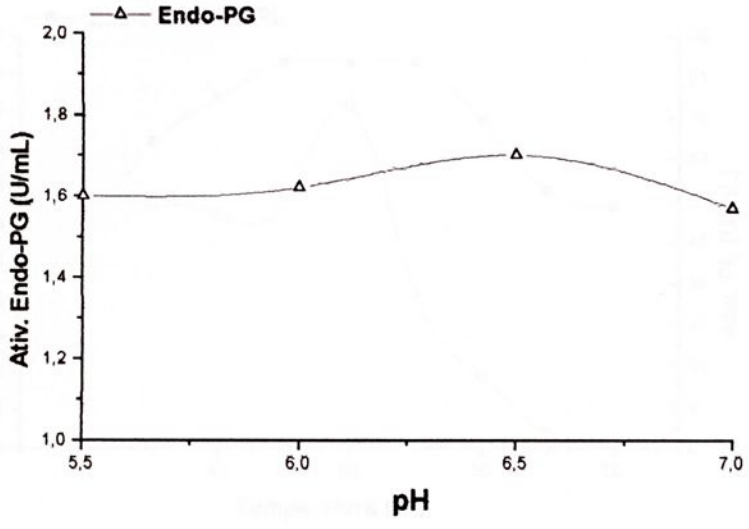


Figura 17: Efeito do pH sobre a atividade da fração correspondente da Endo-PG (△), fracionada em Sephadex G-50.

As enzimas também foram caracterizadas quanto à temperatura de atividade. A Exo-PG III apresentou maior atividade num intervalo de temperatura de 45 a 55°C, porém na faixa entre 35-60°C e enzima manteve aproximadamente 80% de sua atividade (Figura 19). A Endo-PG II foi mais ativa a 50°C, porém apresentou atividade bastante próxima a máxima na faixa de 45-60°C

A PL I apresentou pico de atividade a 50°C, com aproximadamente 75% dessa atividade em temperatura entre 30-45°C. (Figura 18 e 19).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

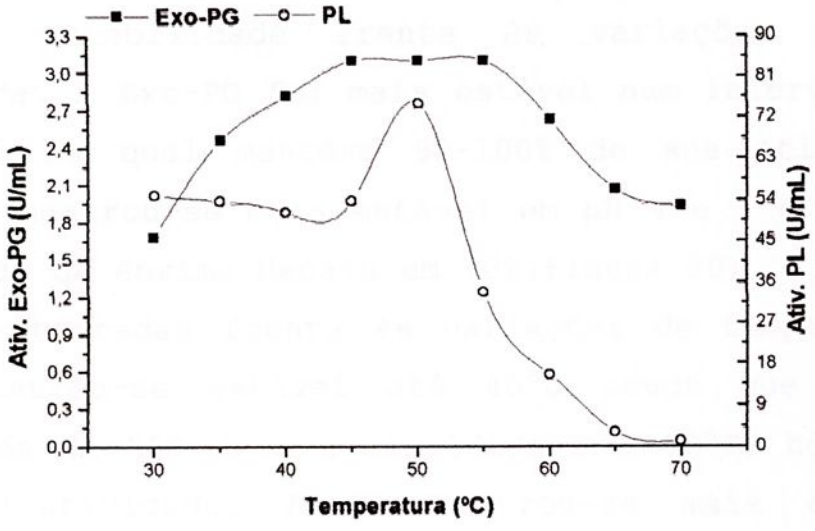


Figura 18: Efeito da de temperatura sobre a atividade da Exo-PG (■) e PL (○) fracionada em Sephadex G-50.

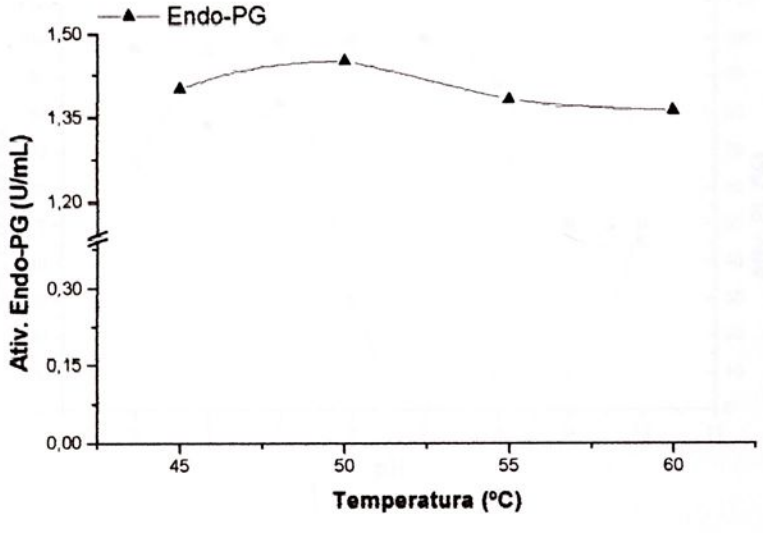


Figura 19: Efeito da temperatura sobre a atividade da Endo-PG (▲) fracionada em Sephadex G-50.

As enzimas Exo-PG e PL ainda foram caracterizadas quanto à estabilidade frente às variações de pH e temperatura. A Exo-PG foi mais estável num intervalo de pH de 5 a 8 no qual manteve 90-100% de sua atividade. A enzima PL mostrou-se mais estável em pH 4 e 5 e, em pH 6, a atividade da enzima decaiu em 70%(Figura 20).

Quando testadas frente às variações de temperatura, a Exo-PG mostrou-se estável até 40°C sendo que em 50°C, houve perda de 50% de sua atividade e a 60°C, houve perda total de atividade. A PL mostrou-se mais estável a temperaturas de 30°. A atividade residual da enzima diminuiu em 60-70% em temperatura acima de 40°C (Figura 21).

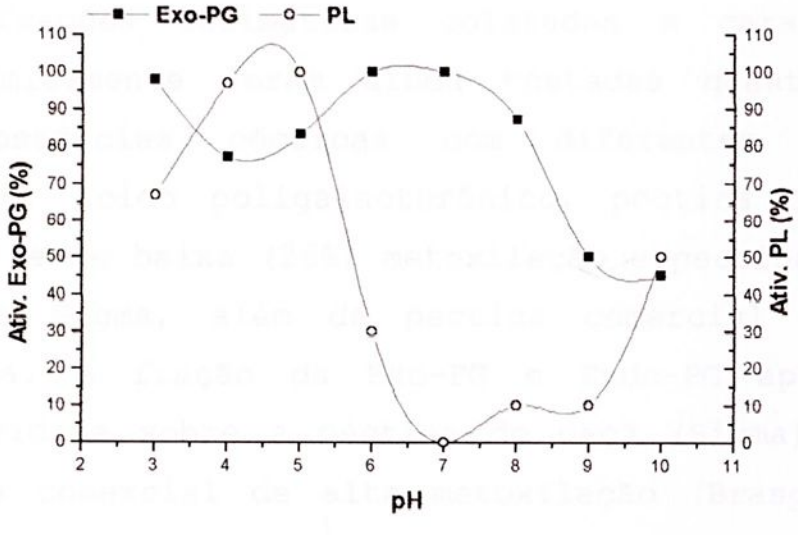


Figura 20: Estabilidade da Exo-PG (■) e PL (○) frente à variações de pH.

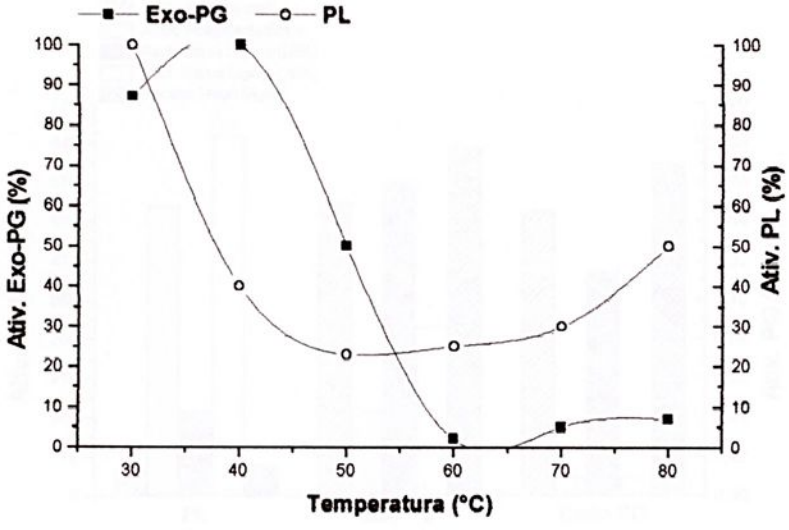


Figura 21: Estabilidade da Exo-PG (■) e PL (○) frente a variações de temperatura.

3 - Especificidade pelo substrato

As frações enzimáticas coletadas e caracterizadas físico-químicamente foram ainda testadas quanto à ação sobre substâncias pécticas com diferentes graus de metoxilação: ácido poligalacturônico, pectina cítrica de alta (92%) e de baixa (26%) metoxilação e pectina de maçã, obtidas da Sigma, além da pectina comercial obtida na Braspectina. A fração da Exo-PG e Endo-PG apresentaram maior atividade sobre a pectina de maçã (Sigma), seguida da pectina comercial de alta metoxilação (Braspectina) e pectina cítrica com 92% de metoxilação (Sigma). A PL apresentou-se mais ativa sobre a pectina com 26% de metoxilação e sobre o ácido poligalacturônico (Figura 22).

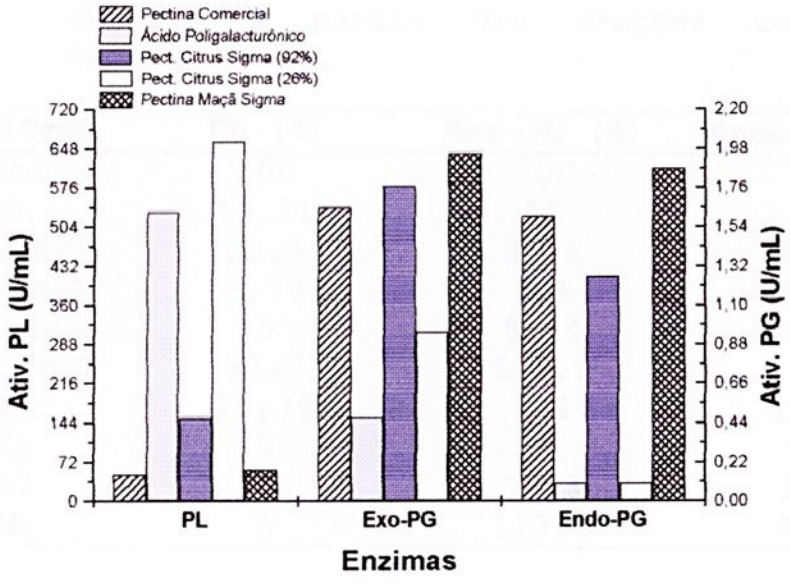


Figura 22: Ação das pectinases sob pectinas de diferentes graus de metoxilação.

4. Efeito dos íons na atividade das pectinases.

As enzimas ainda foram testadas quanto ao efeito de diferentes íons em sua atividade. A atividade de PL analisada foi "levemente" reprimida por cátions mono e divalentes como Ag^{+1}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2}, Hg^{+2} e EDTA cujas atividades residuais variaram de 70-95% em relação ao controle, enquanto que a Exo-PG e Endo-PG foram fortemente inibidas por Ag^{+1}, Ca^{+2}, Hg^{+2}. Porém, suas atividades aumentaram quando os íons testados foram o Mg^{+2}, Zn^{+2}, K^{+1} e EDTA (Tabela 36).

unesp

Tabela 36: Efeito dos íons na atividade das pectinases obtidas a partir das frações coletadas em Sephadex G-50.

Íons (10mM)	PL (%)	Exo-PG (%)	Endo-PG (%)
Controle	100	100	100
$AgSO_4$	13,21	15	27
$CaSO_4.2H_2O$	28,3	31,8	8,75
$MgSO_4.7H_2O$	3,77	104	5,84
$MnSO_4.H_2O$	5	86,4	24,84
$Zn\ SO_4.7H_2O$	37,7	118,2	116,1
$K_2\ SO_4$	20,75	104	122,6
$HgSO_4$	5	15	9,5
CaCl2	5	77,3	19,7
EDTA	5	113,6	64,6

5. Análise dos produtos de hidrólise enzimática

A hidrólise da pectina, utilizando solução enzimática bruta e as frações coletadas de PG (endo e exo) e PL, levaram à liberação basicamente de ácido galacturônico e polímeros intermediários (Figura 23 A, B e C que são repetições). A presença de monômeros de ácido galacturônico, liberado por hidrólise enzimática da pectina, indica a presença de Exo-PG. As manchas correspondentes ao hidrolisado pela Endo-PG, mostram a presença de outros oligossacarídeos. Nota-se também que a fração da PL na figura 24A não foi corada pelo nitrato de prata, pois provavelmente os açúcares liberados não possuem afinidade pelo processo de coloração usado.



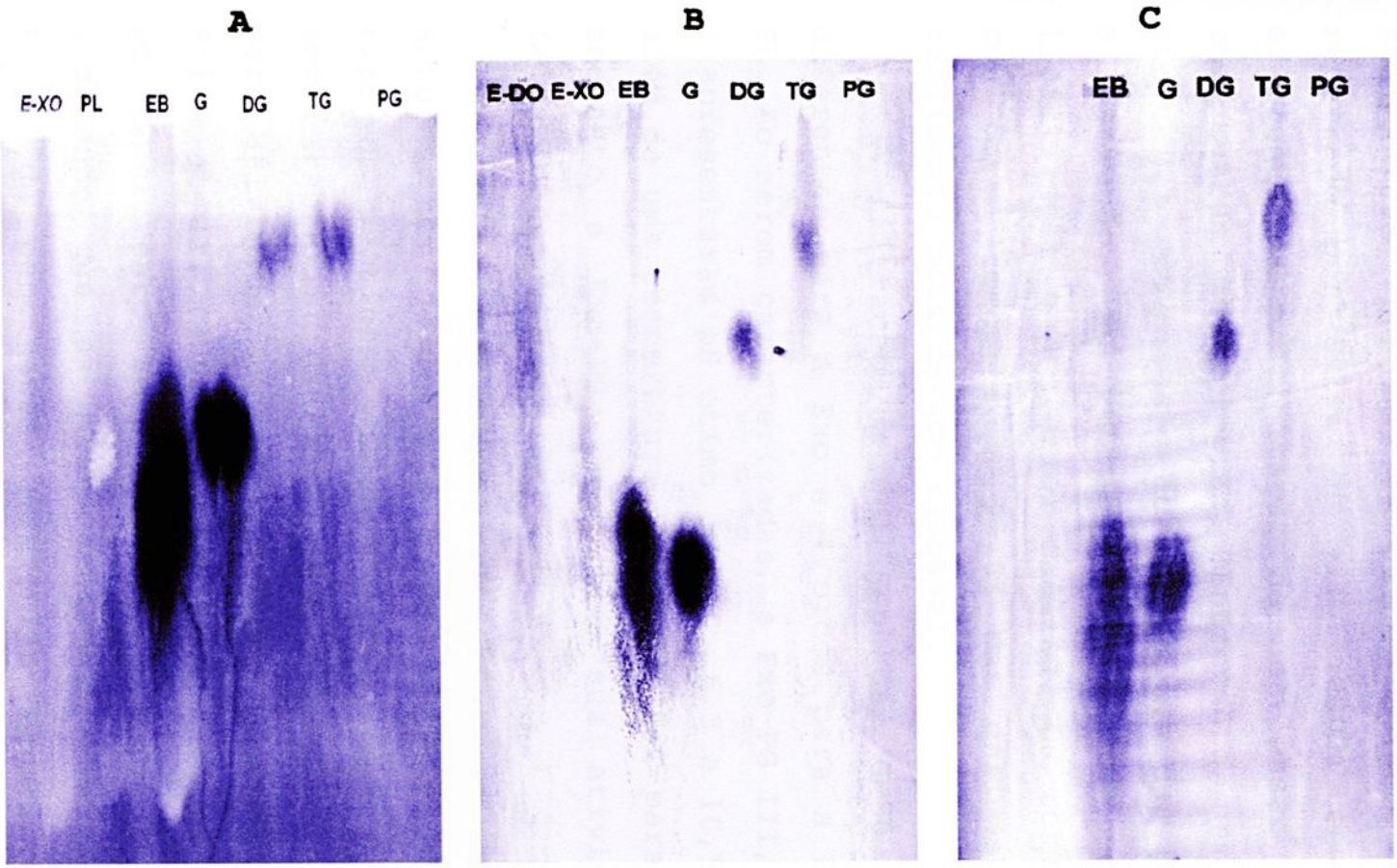


Figura 23: Cromatogramas obtidos a partir da hidrólise da pectina utilizando extrato enzimático bruto e frações separadas obtidas da linhagem *P. viridicatum* RFC3. (E-XO = pectina hidrolisada pela exo-PG (fração 3); E-DO = pectina hdrolisada pela endo-PG (fração 2); PL = pectina hidrolisada pela pectina liase (fração 1); EB = pectina hidrolisada pela enzima bruta; G = Padrão de Ac. Galacturônico; DG= Padrão de Ac. Digalacturônico; TG= Padrão de Ac. Trigalacturônico; PG= Padrão de Ac. Poligalacturônico.

5. DISCUSSÃO

Durante o processo de separação das frações enzimaticas, foi uso de etanol gelado, uma vez que foi reportado por Silva *et al.*, (2002) como sendo o mais eficiente na precipitação de pectinases quando comparado com outras metodologias. Entretanto, em nossos ensaios houve uma recuperação de apenas 14% das PGs. Desta forma, a solução enzimática bruta foi concentrada por liofilização e posterior diálise. Os resultados indicaram que foram recuperados 52,6% das enzimas, sendo este um rendimento considerado razoável.

A filtração em gel Sephadex G-50 mostrou 3 picos diferentes para a Exo e 4 picos para a Endo-PG e para a PL. Ao serem caracterizadas, a Exo-PG III, Endo-PG II e PL I apresentaram pH ótimo de 5,0, 6,5 e 10,5 respectivamente além de uma temperatura ótima de 50°C para a Endo-PG e PL, enquanto a Exo-PG apresentou sua atividade ótima numa faixa de temperatura de 40-60°C.

Quanto ao número de frações separadas, vários autores têm descrito a produção seqüencial de um mesmo tipo de pectinase cujas frações diferenciam-se entre si por características como peso molecular, condições ótimas para atividade ou especificidade (FONSECA e SAID, 1995). Silva *et al.* (2002), separaram 2 frações de PG e 4 de PL em experimento semelhante, com o *P. viridicatum RFC3*, indicando que os microrganismos produzem quantidades e tipos de pectinases diferentes cada vez que um fator dentro do meio de cultivo é variado, como por exemplo, tempo de cultivo e umidade.

Pathak e Sanwal (1998) também separaram 3 frações de PGs, sendo a PG-1 uma Endo-PG e as demais de ação Exo, com

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

pH ótimos de 3,3, 3,7 e 4,3, respectivamente. Quanto à estabilidade térmica, a 60°C as enzimas PG-1 e PG-3, mantiveram 35% e 60% da atividade, enquanto que a PG-2 apresentou uma baixíssima atividade.

Devi e Rao (1996), em estudos de purificação de poligalacturonase produzida por *Aspergillus carbonarius*, separaram três frações enzimáticas, as quais apresentaram atividades ótimas em pH ao redor de 4 e em temperatura na faixa de 50-55°C.

As frações de pectinases separadas, e utilizadas no processo de caracterização, ainda foram testadas em relação ao efeito dos íons sobre suas atividades. A fração III de Exo-PG estudada teve um aumento na atividade em presença de íons como zinco, magnésio, potássio e EDTA enquanto a fração II da Endo-PG mostrou um aumento de atividade em presença apenas de zinco e potássio. Já os demais íons agiram como inibidores da atividade enzimática. Nenhum dos íons testados foi capaz de promover o aumento da atividade de PL, em relação ao controle. Esses dados corroboram os obtidos por Devi e Rao (1996) os quais mostram que algumas frações de PG caracterizadas apresentaram um aumento da atividade em presença de íons como zinco, potássio, cobre, cobalto, bário e alumínio enquanto para outras frações separadas não obtiveram a mesma resposta.

Quanto à especificidade pelo substrato, as pectinases apresentaram características distintas para a PG (endo e Exo) e PL. As PGs estudadas apresentaram especificidade maior por substratos com maior teor de metoxilação na cadeia de pectina enquanto a PL estudada, apresentou uma maior atividade em substratos de baixa metoxilação. As características destas PGs não corroboram

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

com o descrito por Pilnik *et al.* (1973). Segundo esses autores, as PGs fúngicas atuariam preferencialmente em pectinas de baixa metoxilação. Rexova-Benkova *et al.* (1977) ainda sugerem que o grau de metoxilação da cadeia de pectina age como inibidor diminuindo a atividade da PG. Entretanto, Koller e Neukon (1969) conseguiram isolar um fungo capaz de degradar a molécula de pectina com 70% de metoxilação. Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que a Exo-PG analisada é uma polimetilgalacturonase que atua preferencialmente em cadeias esterificadas e não uma PG. As características da PL sugerem que esta seja uma pectato liase. A atuação dessa enzima em pectinas de baixa esterificação é de particular interesse no processamento de vegetais (PILNIK *et al.* 1973) porém, Whitaker (1990) discute que todas as liases necessitam de cálcio para sua ação, exceto as produzidas pelo *Erwinia sp*, e que em alguns casos o requerimento por cálcio provavelmente resulte num mascaramento das cargas negativas de uma pectina que não é completamente metilada.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

5. CONLUSÕES

- Através de cromatografia em Sephadex G50 foi possível separar 3 frações de Exo-PG, 4 frações de Endo-PG e 4 frações de PL, a partir da solução enzimática bruta obtida após 336h de fermentação da mistura de farelo de trigo com bagaço de laranja 1:1 por *P. viridicatum RFC3*.

- As enzimas separadas por cromatografia foram influenciadas pela presença de íons. A atividade de PL foi inibida por Ag^{+1}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2}, Hg^{+2}. A atividade da Exo-PG foi inibida por Ca^{+2}, Ag^{+1}, Mn^{+2} e Hg^{+2} e da Endo-PG pelos íons Ca^{+2}, Ag^{+1}, Mg^{++}, Hg^{+2}, Mn^{+2} e por EDTA.

- As frações de Endo e Exo-PG mostraram-se mais ativas em pectinas de alta esterificação indicando serem polimetilgalacturonases (PMG) de ação Endo e Exo, enquanto a maior atividade da PL em pectinas de baixa esterificação e ácido poligalacturônico sugere que esta seja uma pectato liase.

IX - CAPITULO IV: ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA BRUTA NO PROCESSAMENTO DE SUCOS: APLICAÇÃO DE PECTINASES NA EXTRAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS E VEGETAIS E AVALIAÇÃO DAS MICOTOXINAS PRODUZIDAS PELO *P. viridicatum RFC3*.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias têm utilizado enzimas no processamento de sucos como maçã, pera, uva, ameixa, tomate, além dos sucos cítricos, para a remoção de resíduos de pectina e diversas outras impurezas (KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectinases são usadas também para aumentar o rendimento do suco durante a prensagem e para remover materiais em suspensão, fazendo com que o suco fique livre de arraste de material no processamento. O suco de maçã ao ser prensado, não sofre filtração e nem clarificação inicial, o que deixa o suco com uma alta concentração de polpa.

Pectinases podem ser aplicadas também na separação da polpa e da semente em grãos de café. Essas enzimas removem a mucilagem e a polpa que cobrem o grão de café, reduzindo o tempo de fermentação do grão que, de 40-80 horas passa a ser de 20 horas, aproximadamente (AMORIM e AMORIM, 1977).

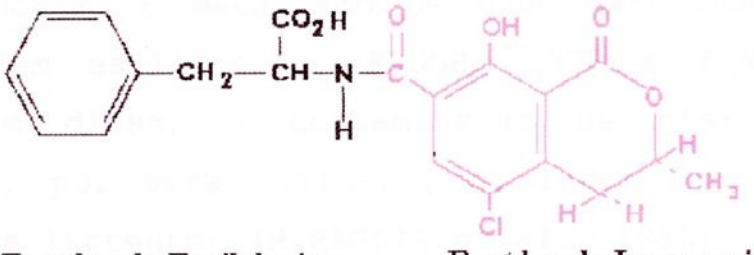
Durante seu crescimento num determinado substrato, os microrganismos não produzem apenas enzimas, mas utilizam-se de outros metabólitos secundários, como resposta a alterações do meio ou como uma forma de proteção contra a competição com outros microrganismos pelo substrato (D´MELLO, 1997, HUSSEIN e BRASEL, 2001 e JANARDHANA *et al.*, 1999). O conhecimento da presença desses metabólitos

num processo fermentativo é fundamental quando o objetivo do mesmo é a produção de substâncias para serem usadas como medicamentos, suplementos alimentares ou como componentes num processo de produção de alimentos, visto que tais metabólitos muitas vezes são tóxicos para diversos tipos de organismos (HUSSEIN e BRASEL, 2001 e HUFF *et al.*, 1988).

Em 1993 a WHO - IARC (WORLD HEALTH ORGANIZATION - INTERNATIONAL AGENCY for RESEARCH on CÂNCER) avaliaram o potencial carcinogênico de Aflatoxinas (AF), Ocratoxinas (OT), Tricotecenos, Zearolenonas (ZEN), Fumorizinas (F). As AF são classificadas como carcinogênicas em humanos (grupo 1) enquanto que as OT e as F são classificadas como possíveis carcinogênicos (grupo 2). Já os Tricotecenos e ZEN não são classificados como carcinogênicos em humanos (WHO-IARC, 1993a,b). As micotoxinas são categorizadas em função de sua estrutura e modo de ação, sendo que uma mesma espécie de fungo pode produzir várias micotoxinas ou várias espécies diferentes de fungos podem produzir uma mesma micotoxina (D'MELLO, 1997), com diferentes atuações em animais ruminantes e não-ruminantes (EATON *et al.* 1994).

Segundo D'Mello (1997), o fungo *Penicillium viridicatum* tem como principal micotoxina a Ocratoxina A (OTA), que também é reportada em espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*. Essa substância é quimicamente descrita como 3,4-diidrometilisocumarina, derivada de uma ligação amida com um grupamento amina da L-β-fenilalanina (COLE e COX, 1981) (Figura 24). Estes compostos são conhecidos por seus efeitos nefrotóxicos em aves e ratos, chegando a promover tumores em humanos (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Essa toxina

foi primeiramente isolada em *Aspegillus ochraceus* e depois apresentada como metabólito secundário em espécies de *Penicillium* de regiões de clima temperado (SMITH e ROSS, 1991).



Resíduo de Fenilalanina **Resíduo de Isocumarina**

Figura 24: Estrutura química da Ocratoxina A (OTA), (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

1.1. Efeitos negativos da ocratoxina A e das aflatoxinas em animais monogástricos e poligástricos.

Em animais monogástricos as respostas para as toxinas podem ser variáveis. Em aves a OTA pode causar mortalidade de embriões (EDRINGTTON *et al.*, 1995) enquanto que em suínos, a adição OTA e AF (2mg/Kg de alimento) causa uma perda de peso de até 52% nos animais quando comparados a grupos controle, levando Huff *et al.* (1988) a concluírem que estas toxinas apresentam um efeito cumulativo no organismo, refletindo em uma baixa síntese protéica (diminuição no nível de albumina, proteínas totais e ureia-N). Harvey *et al.* (1988) reportam ainda, a retenção de água no corpo do animal, anorexia, fraqueza e falta de coordenação motora (GLAVITIS e VANYI, 1995)

O consumo de OTA pode causar aumento e palidez dos rins de suínos (lesões vasculares e manchas), mudanças morfológicas, incluindo danos nos túbulos proximais,

atrofia no epitélio tubular, fibrose renal e hialinização no glomérulo (KROGH, 1991).

Em humanos, a OTA relaciona-se com seu potencial efeito carcinogênico, causando tumores epiteliais no trato urinário, porém, o mecanismo de ação carcinogênica ainda não está bem esclarecido (KROGH, 1978 e FINK-GREMMELS, 1999). Além disso, a contaminação de mães que estão amamentando, por essa toxina, pode levar à transferência da mesma aos lactentes (MIRAGLIA *et al.*, 1995).

Os ruminantes como bovinos e ovelhas, têm apresentado uma maior resistência às micotoxinas como aflatoxinas e fumorizinas. Níveis de 95mg/Kg de Fumorizina em alimentos não tem grandes efeitos tóxicos nem interferem muito no ganho de peso desses animais (GURUNG *et al.*, 1998). Dentre os efeitos tóxicos encontrados, relata-se injúrias no fígado de cervo branco após a administração de AF por um período de 8 semanas (QUIST *et al.*, 1997).

O mecanismo de toxicidade da Ocratoxina A está relacionado com a competição com o substrato pelo sítio ativo das enzimas mitocondriais (XIAO *et al.*, 1996). Durante a respiração celular, a Ocratoxina A age competindo e inibindo a ATPase, succinato desidrogenase e citocromo C desidrogenase (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Wei *et al.* (1985) atribuíram danos às células contaminadas com OTA pela formação de radicais hidroxilas e oxidação lipídica com a formação de peróxidos. Além disso, outros sintomas são atribuídos, como a apoptose nas células dos rins (GEKLE *et al.*, 2000) e inibição competitiva da síntese protéica da fenilanonil-tRNA sintase (CHEEKE, 1998).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Em função do exposto, torna-se fundamental a avaliação dos níveis dessas toxinas na solução enzimática bruta a ser usada nos testes de extração de sucos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de outras enzimas despolimerizantes, além das pectinas, na solução enzimática bruta.
- Estudar a produção de Aflatoxinas e Ocratoxinas pelo fungo *P. viridicatum RFC3*.
- Avaliar a capacidade da enzima bruta e das frações de PG (endo e Exo) e PL coletadas, na extração do suco de frutas e vegetais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1-Medida da atividade enzimática

Foram dosadas as atividades das enzimas brutas produzidas pelo fungo *P. viridicatum RFC3* para sua aplicação na extração de sucos de banana, maçã e cenoura e das frações coletadas para a extração do suco de banana e maçã.

1.1-Atividade de PGs

A atividade de PG foi avaliada conforme descrito no item 6.1 (Capítulo II)

1.2-Determinação da atividade de Endo-PG

A atividade de Endo-PG foi determinada conforme descrito no item 6.2 (Capítulo II)

1.3-Atividade de PL

A mistura de reação para determinar atividade de PL foi realizada conforme descrito no item 6.3 (Capítulo II)

1.4-Atividade de pectina esterase (PE)

A atividade da PE foi medida por quantificação do metanol liberado enzimaticamente a partir das moléculas de pectina, através do método colorimétrico. A reação enzimática ocorrerá em mistura composta por 0,2mL de solução enzimática bruta e 0,8mL de tampão citrato-fosfato

0,2M pH 5,0, contendo 1% de pectina, incubada em temperatura a 45°C por 10 minutos. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de metanol por minuto nas condições de reação.

1.5-Atividade de amilase

A atividade da amilase foi medida através da mistura de reação que constou de 0,8mL de tampão citrato-fosfato a 0,2M e pH 5,0 a 0,3% de amido, com 0,2mL de enzima que foi incubada a 45°C por 10 minutos. O açúcar redutor liberado, após a incubação, foi quantificado pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

1.6-Atividade de xilanase

A atividade da xilanase foi medida através da mistura de reação composta por 0,2mL do extrato enzimático bruto e 1,8mL de uma solução de 0,5% de xilana (Birchwood-Sigma) em tampão acetato 0,2M e pH 5,0. A incubação foi feita em temperatura de 45°C por 10 minutos. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

1.7-Atividade da CMCase

A atividade da CMCase foi determinada pelo mesmo procedimento descrito para a xilanase, exceto que o substrato utilizado foi o carboximetilcelulose (CMC-Sigma) e a substância redutora foi quantificada a partir da curva padrão de glicose pelo método do DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

2. Aplicação da enzima na extração e clarificação de suco.

A solução enzimática bruta, utilizada nesses ensaios, foi obtida a partir da fermentação em erlenmeyers, usando farelo de trigo e bagaço de laranja como substratos a 80 % de umidade, conforme definido no capítulo II. Também foram usadas as frações obtidas nos cromatogramas do capítulo III (fração III para a Exo-PG, fração II para a Endo-PG e fração I para a PL).

As soluções enzimáticas brutas, com perfil enzimático conhecido, foram aplicadas (3 mL) na extração se sucos de banana, maçã e cenoura. Os frutos foram processados e uma alíquota teve o pH corrigido para o ótimo da enzima. Amostras de 15g com pH natural e corrigido até 5,5, com tampão Tris/HCl 0,5M, pH 8,0, foram mantidas à temperatura ambiente e a 50°C por períodos de 1 e 2 horas (Figura 25), o controle do processo ocorreu pela adição de água (3 mL) no lugar da solução enzimática. O processo de extração a vácuo ocorreu através do uso de uma prensa mecânica desenvolvida no próprio laboratório. Os testes foram

feitos em triplicatas e a análise de dados ocorreu inicialmente pela análise da eficiência da enzima em relação à água através da análise de variância (ANOVA). Os dados referentes à extração com enzima foram analisados através de um delineamento fatorial 2^3 completo (temperatura x pH x tempo de extração).

Os experimentos foram codificados agrupando-se temperatura + pH e tempo de ação para o uso de enzima ou água (controle) para extração do suco (Tabela 37).

Tabela 37: Codificação dos dados para realização dos experimentos de extração de sucos.

Cod.	Descrição das condições do ensaio
AN1	**Enzima, 25°C, pH natural, 1 hora**
AN1C	Água, 25°C, pH natural, 1 hora
AN2	**Enzima, 25°C, pH natural, 2 horas**
AN2C	Água, 25°C, pH natural, 2 horas
ON1	**Enzima, 50°C, pH natural, 1 hora**
ON1C	Água, 50°C, pH natural, 1 hora
ON2	**Enzima, 50°C, pH natural, 2 horas**
ON2C	Água, 50°C, pH natural, 2 horas
AO1	**Enzima, 25°C, pH 5,5, 1 hora**
AO1C	Água, 25°C, pH 5,5, 1 hora
AO2	**Enzima, 25°C, pH 5,5, 2 horas**
AO2C	Água, 25°C, pH 5,5, 2 horas
OO1	**Enzima, 50°C, pH 5,5, 1 hora**
OO1C	Água, 50°C, pH 5,5, 1 hora
OO2	**Enzima, 50°C, pH 5,5, 2 horas**
OO2C	Água, 50°C, pH 5,5, 2 horas

unesp

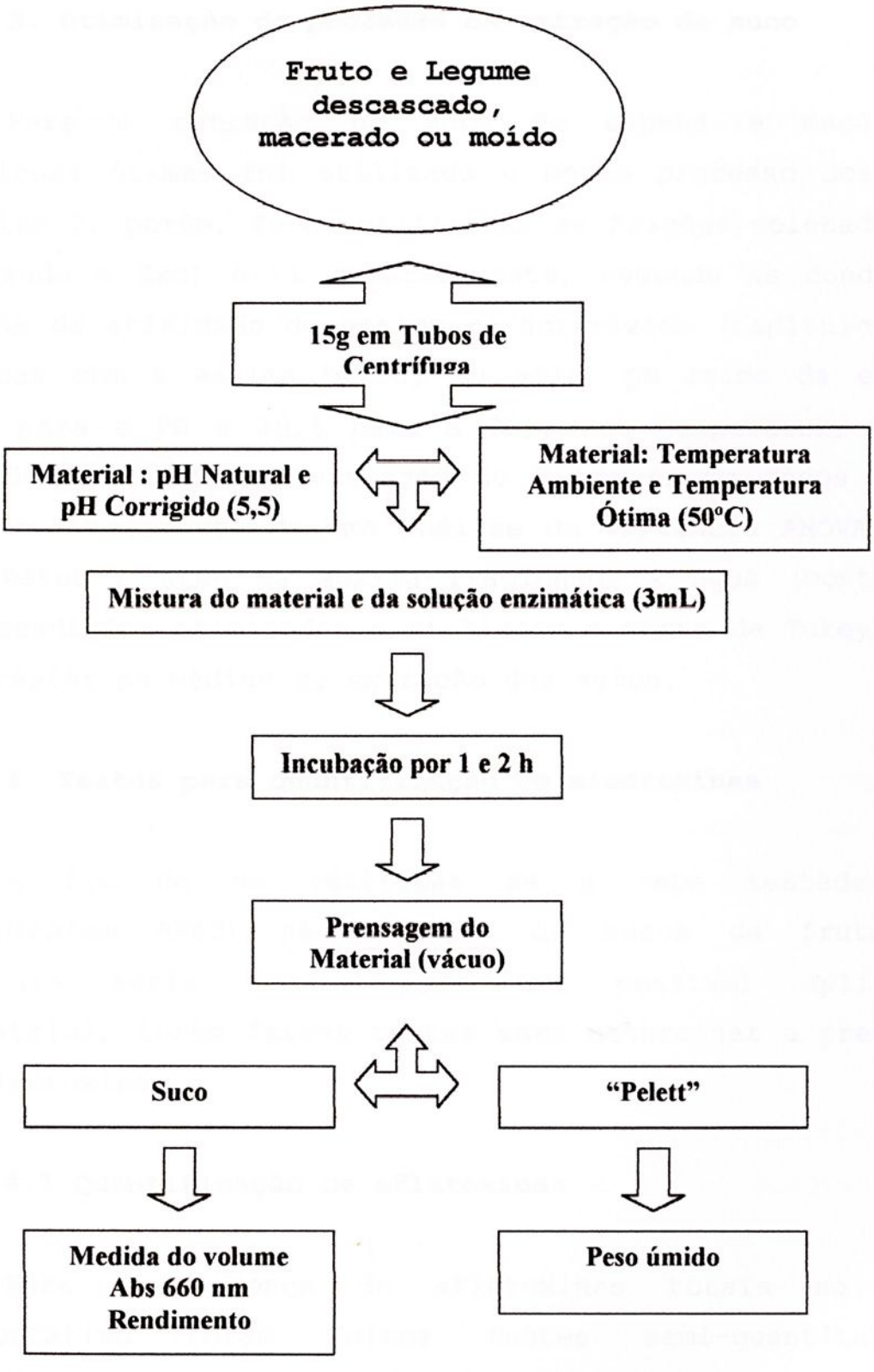


Figura 25: Fluxograma do processo de extração de sucos.

3. Otimização do processo de extração do suco

Para a extração do suco de banana e maçã nas condições ótimas foi utilizado o mesmo processo descrito no item 2, porém, foram utilizadas as frações coletadas de PG (endo e Exo) e PL separadamente, segundo as condições ótimas de atividade da enzima caracterizada (Capítulo III) obtidas com a enzima bruta, ou seja, pH ótimo da enzima (5,5 para a PG e 10,5 para a PL), sua temperatura ótima (50°C) e o tempo de extração de 2 horas. Os dados foram analisados através de uma análise de variância ANOVA onde se testou a ação da enzima fracionada x água (controle) nas condições otimizadas e utilizado o teste de Tukey para contrastar as médias de extração dos sucos.

4. Testes para quantificação de micotoxinas

A fim de se verificar se a cepa testada (*P. viridicatum RFC3*) na extração de sucos de frutas e vegetais seria segura para uma possível aplicação industrial, foram feitos testes para determinar a presença de micotoxinas.

4.1 Quantificação de aflatoxinas

Para a presença de aflatoxinas totais no meio fermentativo foram feitos testes semi-quantitativos através do uso do kit rápido de detecção AFLASCAN® obtido da Rhone diagnosties, que se utiliza de colunas de imunoafinidade e detectores de fluorescência para detectar a presença da toxina.

Para o processo foram utilizados 50g do material fermentado acrescido de 4g de NaCl e 250mL de metanol a 60%, agitado por 1 minuto a alta velocidade. Após agitação, o material foi diluído em 250mL de água destilada. Cerca de 50 a 100mL do material foi filtrado e aplicado na coluna de imunoafinidade, numa velocidade de eluição de 2 a 3mL por minuto. A seguir a coluna foi lavada com 10mL de água destilada, sendo aplicado 1mL de metanol para eluição do material adsorvido (1 gota por segundo). O volume eluído foi coletado num tubo ao qual adicionadou-se 1mL de água destilada e 1mL de clorofórmio. Estes foram agitados e novamente introduzidos na coluna de imunoafinidade, conectada a uma ponteira indicadora de fluorescência. A presença de aflatoxina foi quantificada pela leitura da ponteira em luz UV 366nm, comparando-se ao cartão padrão fornecido pelo kit. Foram feitos também os testes para o substrato esterilizado suspenso em água destilada para se detectar a presença da toxina neste, antes do inóculo do fungo.

4.2 Quantificação de ocratoxinas totais

Para a quantificação de ocratoxinas totais foi utilizado o Kit OCHRASCAN® obtido da Rhone diagnosties. Para a extração da toxina foram utilizados 10g do material fermentado misturado a 200mL de uma solução de bicarbonato de sódio a 1% e agitado por 2 minutos. O material foi filtrado e 20mL foram aplicados na coluna de imunoafinidade numa velocidade de 2 a 3mL por minuto. Posteriormente, a coluna foi lavada com uma solução de 20% de metanol (5mL/min). A toxina foi eluída da coluna com 1,5mL de uma mistura de acido acético: metanol (2:98 v/v)

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

e coletada em tubo teste. Ao volume coletado, foram adicionados 6mL de tampão fosfato e 3mL de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente e após separadas as fases, a porção superior foi descartada. O restante do material foi aplicado na ponteira indicadora e, para identificação da banda fluorescente, foi feita a leitura em lâmpada UV a 366nm e comparada a quantidade de toxina produzida com o cartão de identificação fornecido. Foram feitos também os testes para o substrato esterilizado para se detectar a presença da toxina antes do inóculo do fungo

4. RESULTADOS

1 - Uso de enzimas na extração de sucos.

Foram realizados ensaios com o intuito de se avaliar a interferência da solução enzimática bruta, obtidas por fermentação nas condições otimizadas, quando utilizada na liquefação de banana, cenoura e maçã. Nesses ensaios variou-se o pH do material macerado (pH natural e 5,5), a temperatura (ambiente e 50°C) e o tempo de extração (1 e 2 horas). Os experimentos foram organizados em esquema fatorial 2^3 completo, como descrito na tabela 37 (materiais e métodos), apresentaram os seguintes resultados conforme descrito na tabela 38.

Tabela 38: Atividade de enzimas despolimerizantes determinadas na solução enzimática bruta usada na extração de sucos

Enzima	Atividade (U/mL)
Exo-PG	8,0
Endo-PG	3,47
PL	nd
CMCase	9,9
Xilanase	38,89
Amilase	8,4
Pectina Esterase	1,5
Proteínas Totais	23,8µg/mL

Para as enzimas separadas por cromatografia foram utilizadas as condições otimizadas para atividade das pectinases, ou seja, o macerado obtido do fruto teve seu pH corrigido até 5,5 para as PGs (endo e Exo) e 10,5 para a PL, assim como a temperatura de incubação que foi de 50°C por 2 horas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Os resultados originais obtidos na extração dos sucos são presentes na tabela 1B e 1C (apêndice) e analisados estatisticamente conforme os itens a seguir.

1.1. Extração de suco banana

Para a extração do suco de banana, a fruta foi macerada e 15g misturados a 3mL da solução enzimática bruta ou água (controle), com pH natural (4,65) ou corrigido a 5,5. A análise estatística, para comprovar a eficiência da enzima em relação ao controle na extração do suco, através do teste F, mostrou que houve diferença significativa a 1% de probabilidade, entre os tratamentos aplicados, ou seja, houve variação significativa no volume de suco extraído, em função do tratamento aplicado (Tabela 39).

Tabela 39: Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de banana.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Bloco	2	0,6704	0,3352	$0,41^{NS}$
(Tratamentos)	15	504,7215	33,6481	$41,03^{**}$
Resíduo	30	24,6029	0,8201	-
Total	47	529,9948	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Embora não tenha sido significativo o efeito do bloco, o teste de Tukey mostrou que nos tratamentos nos quais foi utilizada a solução enzimática, houve maior extração do suco. A média geral do ensaio foi de 9,53 ± 0,90 mL de suco extraído (Tabela 40).

Tabela 40: Teste de Tukey para as médias da extração do suco de banana dentro dos tratamentos.

Tratamentos	Δ	Média
Enzima, 50°C, pH 5,5, 2h	2,7554	13,53 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,5, 2h	2,7554	13,40 ^{A}
Enzima, 50°C, pH 5,5, 1h	2,7554	13,40 ^{A}
Enzima, 50°C, pH 4,65, 2h	2,7554	12,53 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 4,65, 2h	2,7554	12,33 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,5, 1h	2,7554	12,30 ^{A}
Enzima, 50°C, pH 4,65, 1h	2,7554	12,26 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 4,65, 1h	2,7554	11,66 ^{A}
Água, 25°C, pH 4,65, 1h	2,7554	7,80 ^{B}
Água, 50°C, pH 5,5, 2h	2,7554	7,80 ^{B}
Água, 50°C, pH 4,65, 2h	2,7554	7,00 ^{B}
Água, 25°C, pH 5,5, 2h	2,7554	6,20 ^{B}
Água, 25°C, pH 4,65, 2h	2,7554	6,00 ^{B}
Água, 25°C, pH 5,5, 1h	2,7554	5,80 ^{B}
Água, 50°C, pH 4,65, 1h	2,7554	5,40 ^{B}
Água, 50°C, pH 5,5, 1h	2,7554	5,20 ^{B}

A partir desses dados, as análises estatísticas consideram apenas os tratamentos nos quais foi utilizada a solução enzimática bruta.

Os volumes do suco de banana extraídos com o uso da enzima, sob diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração não foram estatisticamente diferentes entre si, a 5% de probabilidade. A média de extração do ensaio foi de 12,67 ± 1,15 mL (Tabela 41).

Como nenhum dos fatores aplicados influenciaram significativamente a ação da enzima, pode-se supor que os mesmos não incluíram os valores de pH, temperaturas ou tempo de extração ótimos para a extração enzimática do



suco de banana. Apesar disso, nota-se que as condições ótimas para as atividades de Exo-PG e Endo-PG, determinadas nos tratamentos de extração do suco (50°C e pH 5,5) levaram a volumes de extração um pouco maiores (Tabela 42).

Tabela 41: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Temperatura (T)	1	1,5504	1,5504	1,17 ^{NS}
pH (p)	1	5,5104	5,5104	4,14 ^{NS}
Tempo Ação (t)	1	1,7604	1,7604	1,32 ^{NS}
Fator T x p	1	0,0704	0,0704	0,05 ^{NS}
Fator T x t	1	0,7004	0,7004	0,52 ^{NS}
Fator p x t	1	0,0338	0,0338	0,025 ^{NS}
Fator T x p x t	1	0,1204	0,1204	0,090 ^{NS}
(Tratamentos)	7	9,7462	1,3923	-
Resíduo	16	21,2733	1,3296	-
Total	23	31,0195	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 42: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das enzimas entre os diferentes tratamentos.

Temperatura (°C)	**pH**	**Tempo ação (h)**	**Δ**
50 (12,93)^{A}	5,5 (13,16)^{A}	2 (12,95)^{A}	0,9986
25 (12,42)^{A}	Natural (12,20)^{A}	1 (12,40)^{A}	0,9986

A extração do suco de banana com as enzimas fracionadas mostraram que nenhuma das frações isoladamente foi capaz de promover uma alteração significativa na extração em relação ao controle (água) ao nível de 5% de probabilidade (tab 43, 44 e 45).

Tabela 43: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a fração I da PL coletada.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
(Tratamentos)	1	18,0	18,0	$2,73^{NS}$
Resíduo	6	39,5	6,58	-
Total	7	57,5	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 44: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a fração II da Endo-PG coletada.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
(Tratamentos)	1	13,78	13,78	$2,03^{NS}$
Resíduo	6	40,68	6,78	-
Total	7	54,46	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 45: Análise de variância da extração do suco de banana utilizando a fração III da Exo-PG coletada.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
(Tratamentos)	1	6,12	6,12	$1,28^{NS}$
Resíduo	6	28,75	4,79	-
Total	7	34,87	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Porém, dentre as médias gerais para a extração do suco, a fração II da Endo-PG foi a que promoveu a maior média (10,31 ± 2,60 mL) quando comparada as demais frações enzimáticas (9,87 ± 2,18 mL para a Exo-PG III e 9,75 ± para a PL I). Os testes de Tukey revelaram que não houve um contraste significativo entre as médias das frações enzimáticas e a água na extração do suco, porém, a extração com a enzima foi ligeiramente maior (Tabela 46).

Tabela 46: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das frações enzimáticas coletadas.

PL - I		***Endo-PG - II***		***Exo-PG - III***	
Tratamentos	*Δ*	*Tratamentos*	*Δ*	*Tratamentos*	*Δ*
EZ ($11,25^{A}$)	4,43	**EZ** ($11,62^{A}$)	4,50	**EZ** ($10,75^{A}$)	3,78
AG ($8,25^{A}$)		**AG** ($9,00^{A}$)		**AG** ($9,00^{A}$)	

*** EZ = fração da enzima correspondente aplicada, AG = controle feito com água**

1.2. Extração de suco de maçã

Para a extração do suco de maçã, foram aplicados os mesmos tratamentos descritos para o ensaio anterior. A análise de variância indicou a eficiência da solução enzimática, em relação ao controle, para a extração do suco. O teste F mostrou que houve uma variação significativa a 5% de probabilidade na eficiência de extração dentro dos blocos e a 1% de probabilidade dentre os tratamentos (Tabela 47).

Tabela 47: Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de maçã.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Bloco	2	6,5617	3,2808	4,33*
(Tratamentos)	15	139,25	9,2833	12,24**
Resíduo	30	22,7450	0,7582	-
Total	47	168,5567	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey mostrou que os maiores volumes médios de suco extraído foram obtidos quando a enzima estava presente no tratamento aplicado, principalmente nas condições otimizadas. A média geral do ensaio foi de 10,70± 0,87 mL de suco extraído (Tabela 48).

Tabela 48: Teste de Tukey para as médias da extração do suco de maçã entre os tratamentos.

Tratamentos	Δ	Média
Enzima, 50°C, pH 5,5, 2h	2,6493	14,33 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,5, 2h	2,6493	13,00 ^{AB}
Enzima, 50°C, pH 3,97, 2h	2,6493	12,66 ^{AB}
Enzima, 50°C, pH 5,5, 1h	2,6493	12,33 ^{ABC}
Enzima, 50°C, pH 3,97, 1h	2,6493	11,33 ^{BCD}
Água, 50°C, pH 3,97, 2h	2,6493	11,00 ^{BCD}
Água, 50°C, pH 5,5, 1h	2,6493	11,00^{BCD}
Enzima, 25°C, pH 3,97, 2h	2,6493	10,6 ^{BCD}
Enzima, 25°C, pH 5,5, 1h	2,6493	10,66^{BCD}
Água, 25°C, pH 5,5, 2h	2,6493	10,00^{CDE}
Água, 50°C, pH 3,97, 1h	2,6493	10,00^{CDE}
Água, 50°C, pH 5,5, 2h	2,6493	10,00^{CDE}
Enzima, 25°C, pH 3,97, 1h	2,6493	9,33^{DE}
Água, 25°C, pH 3,97, 2h	2,6493	9,00^{DE}
Água, 25°C, pH 3,97, 1h	2,6493	8,00^{E}
Água, 25°C, pH 5,5, 1h	2,6493	8,00^{E}

A aplicação da análise de variância somente para os tratamentos nos quais foi utilizada a enzima indicou efeito significativo ao nível de 5% do fator pH e a 1% de probabilidade para os fatores temperatura e tempo de extração. A interação entre esses fatores não foi capaz de promover diferença significativa a 5% de probabilidade no volume de suco extraído. A média de extração do ensaio foi de 11,79 ± 1,33 mL (Tabela 49).

Tabela 49: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
Temperatura (T)	1	18,204	18,204	10,20**
pH (p)	1	14,8838	14,8838	8,34*
Tempo Ação (t)	1	18,5504	18,5504	10,39**
Fator T x p	1	0,3504	0,3504	0,19 NS
Fator T x t	1	0,0504	0,0504	0,02 NS
Fator p x t	1	1,0004	1,0004	0,56 NS
Fator T x p x t	1	0,0338	0,0338	0,018 NS
(Tratamentos)	7	53,0696	7,5814	-
Resíduo	16	28,5400	1,7838	-
Total	23	81,6096	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey para os tratamentos em separado revelou contrastes significativos entre as médias sendo observado que as condições ótimas para as atividades das PGs levaram a maiores volumes de suco extraídos (Tabela 50).

Tabela 50: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de maçã com o uso das enzimas entre os diferentes tratamentos.

Temperatura (°C)	**pH**	**Tempo ação (h)**	**Δ**
50 (12,66) A	5,5 (12,58) A	2 (12,67) A	1,1566
25 (10,95) B	Natural (11,00) B	1 (10,91) B	1,1566

A extração do suco de maçã com as enzimas fracionadas mostrarou que nenhuma das frações, quando aplicadas isoladamente, foi capaz de promover uma alteração significativa no volume de suco extraído em relação ao

controle (água) ao nível de 5% de probabilidade conforme já havia sido observado na extração do suco de banana (tab 51, 52 e 53).

Tabela 51: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a fração I da PL coletada.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
(Tratamentos)	1	6,12	6,12	$1,62^{NS}$
Resíduo	6	22,75	3,79	-
Total	7	28,87	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 52: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a fração II da Endo-PG coletada.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
(Tratamentos)	1	2,00	2,00	$0,89^{NS}$
Resíduo	6	13,50	2,25	-
Total	7	15,50	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 53: Análise de variância da extração do suco de maçã utilizando a fração III da Exo-PG coletada.

Causas de Variação	*G.L.*	*S.Q.*	*Q.M.*	*F*
(Tratamentos)	1	0,0	0,00	$0,00^{NS}$
Resíduo	6	27,50	4,58	-
Total	7	27,50	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Porém, dentre as médias gerais para a extração do suco, a fração III da Exo-PG foi a que promoveu a maior média (12,25 ± 2,14 mL) seguida da fração I da PL (12,12 ± 1,94) e da Endo-PG II (11,75 ± 1,50 mL). Os testes de Tukey revelaram novamente que não houve um contraste

significativo entre as médias das frações enzimáticas e a água na extração do suco, porém, as extrações com as enzimas foram ligeiramente maiores, exceto para a Exo-PG III cuja extração média foi idêntica ao processo utilizando água (Tabela 54).

Tabela 54: Teste de Tukey para as médias dos ensaios de extração de suco de banana com o uso das frações enzimáticas coletadas.

PL - I		***Endo-PG - II***		***Exo-PG - III***	
Tratamentos	*Δ*	*Tratamentos*	*Δ*	*Tratamentos*	*Δ*
EZ ($13,00^{A}$)	3,36	**EZ** ($12,25^{A}$)	2,59	**EZ** ($12,25^{A}$)	3,70
AG ($11,25^{A}$)		**AG** ($11,25^{A}$)		**AG** ($12,25^{A}$)	

*** EZ = fração da enzima correspondente aplicada, AG = controle feito com água**

1.3. Extração de suco de cenoura

Para a extração do suco de cenoura, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente. A análise de variância, realizada para a comparação entre o uso da enzima ou de água nos tratamentos, mostrou uma diferença significativa a 1% de probabilidade entre os mesmos (Tabela 55).

Tabela 55: Análise de variância para volume extraído em função do tratamento aplicado no suco de cenoura.

Causas de Variação	***G.L.***	***S.Q.***	***Q.M.***	***F***
Bloco	2	3,2879	1,6440	$2,76^{NS}$
(Tratamentos)	15	38,8233	2,5882	$4,35^{**}$
Resíduo	30	17,8654	0,5955	-
Total	47	59,9767	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

O teste de Tukey, aplicado para os tratamentos, mostrou que não houveram diferenças significativas entre os volumes médios de suco extraído nas diferentes condições, porém nota-se que as maiores médias foram obtidas na presença da enzima e nas condições ótimas para a ação da mesma. A média geral do ensaio foi de 8,04 ± 0,77 U/mL de suco extraído (Tabela 56).

Tabela 56: Teste de Tukey para as médias da extração do suco de cenoura dentro dos tratamentos.

Tratamentos	Δ	Média
Enzima, 50°C, pH NATURAL, 1h	2,34	9,16 ^{A}
Enzima, 50°C, pH 5,5, 1h	2,34	9,16 ^{A}
Água, 50°C, pH 5,0, 2h	2,34	9,03 ^{A}
Água, 50°C, pH 5,5, 2h	2,34	9,00 ^{A}
Enzima, 50°C, pH 5,0, 2h	2,34	9,00 ^{A}
Enzima, 50°C, pH 5,5, 2h	2,34	9,00 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,5, 1h	2,34	8,33 ^{A}
Água, 50°C, pH 5,0, 1h	2,34	8,00 ^{A}
Água, 50°C, pH 5,5, 1h	2,34	8,00 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,0, 1h	2,34	8,00 ^{A}
Água, 25°C, pH 5,0, 1h	2,34	7,00 ^{A}
Água, 25°C, pH 5,0, 2h	2,34	7,00 ^{A}
Água, 25°C, pH 5,5, 2h	2,34	7,00 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,0, 2h	2,34	7,00 ^{A}
Enzima, 25°C, pH 5,5, 2h	2,34	7,00 ^{A}
Água, 25°C, pH 5,5, 1h	2,34	6,96 ^{A}

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Quando analisados somente os tratamentos na presença da enzima, os volumes de suco de cenoura extraídos apresentaram diferenças significativas, a 5% de probabilidade, apenas para o fator temperatura, segundo a análise de variância. Os demais fatores não foram capazes de promover um efeito significativo durante o processo de extração de sucos. A média de extração do ensaio foi de 8,29 ± 1,12 mL (Tabela 57).

Tabela 57: Análise de variância da extração do suco de cenoura utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração.

Causas de Variação	***G.L.***	***S.Q.***	***Q.M.***	***F***
Temperatura (T)	1	15,0417	15,0417	11,83**
pH (p)	1	0,0000	0,0000	0,00 NS
Tempo Ação (t)	1	2,0417	2,0417	1,60 NS
Fator T x p	1	0,0000	0,0000	0,00 NS
Fator T x t	1	1,0417	1,0417	0,81 NS
Fator p x t	1	0,0000	0,0000	0,00 NS
Fator T x p x t	1	0,0000	0,0000	0,00 NS
(Tratamentos)	7	18,1250	2,5893	-
Resíduo	16	20,3333	1,2708	-
Total	23	38,4583	-	-

NS Interação não significativa, ** Interação signficativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Foi realizado o teste de Tukey para os tratamentos com a presença da enzima que revelou uma diferença significativa de médias apenas para a temperatura, com maior volume extraído a 50°C. Não houve diferença significativa para o fator pH, o que já era esperado visto que o pH da cenoura (5,0) foi muito próximo ao pH ótimo da

enzima. Também não foi detectada diferença significativa para o fator tempo de ação enzimática (de extração) (Tabela 58).

Tabela 58: Análise de variância da extração do suco de cenoura utilizando a solução enzimática bruta em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de extração.

Temperatura (°C)	pH	Tempo ação (h)	Δ
50 (9,08)^{A}	Natural (8,29) ^{A}	1 (8,58) ^{A}	0,9763
25 (7,50)^{B}	5,5 (8,29) ^{A}	2 (8,00) ^{A}	0,9763

2. Testes para determinação de micotoxinas

Foram feitos os testes para se avaliar a capacidade do microrganismo em produzir micotoxinas (Aflatoxina e Ocratoxina) para os quais foram utilizados Kits de determinação (AFLASCAN® e OCHRASCAN®). Os resultados indicaram que para o substrato esterilizado, utilizado como controle, foram detectados níveis de aflatoxinas totais de até 10ppb (10 µg/Kg) nos substratos (farelo de trigo e bagaço de laranja). Enquanto que, para a ocratoxina testada os níveis foram de até 4 ppb (4 µg/Kg) para o bagaço de laranja e de 10-20 ppb (20 µg/Kg) para o farelo de trigo. Os testes de micotoxinas ainda foram feitos no meio fermentado após 14 dias de cultivo (336h) do qual seria extraída a solução enzimática bruta para aplicação no suco de frutas. Estes testes indicaram uma concentração de aflatoxina no meio fermentado menor que 1ppb (< 1 µg/Kg), enquanto que para a ocratoxina, foi

detectada a presença de até 4ppb (4 µg/Kg) (Tabela 59). Pelos resultados, pode-se dizer que a diminuição no nível de Aflatoxina e Ocratoxina, após 14 dias de fermentação, possa ser o resultado da degradação destes componentes do meio fermentativo, realizado pelo fungo *P. viridicatum RFC3*.

Tabela 59: Níveis de ocratoxina e aflatoxina detectados no substrato esterilizado e fermentado pelo fungo *P. viridicatum RFC3*.

Substrato	Aflatoxina (ppb)	Ocratoxina (ppb)
Farelo de trigo (controle)	< 10	< 4
Bagaço de laranja (controle)	< 10	10 - 20
Meio fermentado: farelo de trigo + bagaço de laranja (1:1)	< 1	< 4

5. DISCUSSÃO

A solução enzimática bruta, obtida por FSS sob as condições determinadas como favoráveis à produção de pectinases pelo fungo *P. viridicatum RFC3* foi usada nos testes de extração de sucos sob condições naturais de pH do substrato (banana pH 4,65, maçã pH 3,97 e cenoura pH 5,0), pH 5,5 e sob temperaturas ambiente e 55°C.

A aplicação da solução enzimática na extração do suco de banana levou a um rendimento de 80-97% (v/p), além de diminuir visualmente a viscosidade aparente do substrato, o que é muito importante, uma vez que a viscosidade dificulta a filtração do suco, além de provocar propriedades indesejáveis no mesmo (VAILLANT, *et al.*, 1999). O rendimento obtido foi muito superior ao obtido pelo "pool" de enzimas de *Curvularia inaequalis* (GOMES *et al.*, 2001) e *Aerobasidium sp.* (IEMBO, 2000) cujo rendimento foi de 3 e 50% respectivamente.

Para o suco de maçã, o aumento no rendimento da extração de 30 a 60%, nas condições ótimas para atividade, também foi superior ao obtido pelos autores citados cujo maior rendimento não passou de 10%. Alvarez *et al.* (1998) investigaram a influência do tratamento enzimático do suco de maçã antes da ultrafiltração e observaram que o fluxo da filtração foi dependente da quantidade de pectina presente no suco. Assim, filtrar o suco despectinizado enzimaticamente produziu um aumento de 3 vezes no volume extraído. Além disso, o uso de enzimas no processamento auxilia a extração de sólidos solúveis (SREENATH *et al.*, 1994), na diminuição da viscosidade do suco e do conteúdo de pectina (ALVAREZ *et al.*,1998).



Na extração do suco de maçã observou-se que a correção do pH para 5,5 (pH natural da fruta foi 4,0) levou a aumento significativo do rendimento quando a enzima foi utilizada.

Já para a extração do suco de cenoura, foi obtido um rendimento máximo de 29% para as condições mínimas do ensaio (25°C, pH 5,5, 1 hora).

O pH foi outro fator importante para a extração de sucos. Frutos caracteristicamente mais ácidos como maçã e banana apresentaram um menor volume de suco extraído, possivelmente pela menor atividade das enzimas nesses pH ou ainda, pela geleificação do substrato e aprisionamento das partículas de suco no gel. Quando o pH dos substratos foi corrigido a 5,5 esses efeitos foram reduzidos (PARKIN, 1993). No caso da cenoura, que apresentou o pH próximo ao ótimo da enzima, o volume de suco extraído mostrou-se influenciado apenas pela temperatura, a qual promoveu um maior rendimento na extração quando a temperatura foi de 50°C.

A presença das outras enzimas como xilanases, amilases, CMCases e Pectina esterases pode ter influenciado a extração dos sucos. A presença de enzimas como xilanases e celulase, nos preparados enzimáticos de pectinases, têm sido relacionados como um fator desejável, visto que as mesmas atuam sinergisticamente com as pectinases no rompimento da parede celular vegetal facilitando a liberação do suco. Por outro lado, a presença de amilase também pode contribuir no processo de clarificação de alguns tipos de sucos (KASHYAP *et al.*, 2001, KETSA e DAENGKANIT 1999, PIFFERI *et al.*, 1989, DA SILVA *et al.*, 1997)

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Os dados mostram a viabilidade do uso das pectinases brutas produzidas pelo *P. viridicatum RFC3* na extração de sucos, quando comparadas às frações coletadas.

Com relação à produção de micotoxinas, os dados revelam a diminuição dos níveis tanto de OTA quanto de AF do meio esterilizado para o substrato fermentado, indicando que esta linhagem do fungo *P. viridicatum RFC3* possa não ser uma grande produtora das toxinas em FSS e que, além disso, possa estar degradando as toxinas já presentes. Foi demonstrado que algumas espécies fúngicas degradam as micotoxinas para a obtenção de aminoácidos ou gerando outros compostos menos tóxicos (WOGAN, 1966, MERTENS 1979 e VARGA *et al.*, 2000). Os níveis de AF detectados (4 ppb) no material fermentado estão muito abaixo daqueles considerados críticos na alimentação animal e humana (20 ppb para AF) segundo o Ministério da Saúde - Anvisa (2002).

Espécies de *P. viridicatum* e *P. verrucossum* podem ser diferenciadas em nível de subespécie, de acordo com os níveis de produção de OTA e patulina, num mesmo meio, indicando uma variação genetica com relação à produção de toxinas. Essa diferença na produção também foi observada como dependente do diâmetro da colônia e na sua coloração (PITT, 1987) e da presença de antibióticos ou outros antifúngicos no meio (FRISVAD, 1983).

Ainda, há evidência de que, embora a presença de metabólitos indesejáveis possa ocorrer num processo de FSS, é possível o controle da produção dos mesmos, mediante alteração de fatores físico-químicos, como umidade, pH e tempo de fermentação (BUDIARSO *et al.*, 1971). Por outro lado, deve ser considerado que os substratos de origem natural, como resíduos vegetais,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

podem vir para o processo já contaminados com tais metabólitos e, dessa forma, é importante que se conheça a capacidade do microrganismo, usado no processo, em degradá-los.

6. CONCLUSÕES

- Os fatores temperatura, pH e tempo de extração influenciaram os volumes de suco de banana, maçã e cenoura, obtidos quando foi utilizada a solução enzimática.
- A enzima bruta empregada apresentou maior eficiência na extração de sucos de banana, maçã e cenoura, quando comparada às frações enzimáticas aplicadas isoladamente.
- Os níveis de micotoxinas no substrato fermentado estão muito abaixo da quantidade mínima requerida pelos órgãos de saúde pública.
- Houve uma diminuição no nível de micotoxinas no meio de crescimento ao longo do período fermentativo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, D.; HULSARE, R.; WHITE, N. D. G.; JAYAS, D. S.; MARQUARDT, R. R. Mycotoxin Formation In Hulless Barley During Granary Storage At 15 And 19% Moisture Content. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, p. 291-305, 1999.

ACUÑA-ARGÜELLES, M. E., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., FAVELA-TORRES, E. Production and Properties of Three Pectinolytic Activities Produced by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid-state Fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.43, p.808-814, 1995.

ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. **Methods Enzymol.**, v.8, p.628-631, 1996.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic encimes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n°1, p. 21-28, 1998.

ALVAREZ, S.; ALVAREZ, R.; RIERA, F. A.; COCA, J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 138, p. 377-382, 1998.

AMORIM, H, v.; AMORIM, V. L. Coffee enzyme and quality. In: Ori, R.; St. Angelo, A. J. (Eds), Enzymes in Food beverage processing. ACS Symposium, v. 47, p. 27-56, 1977. (Apud) KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI,

R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), MINISTÉRIO DA SAÚDE: Resolução RDC nº 274, de 15 de Outubro de 2002, **Diário Oficial da União**, publicado em 16/10 de 2002.

ASHOUR, S.A.; EL-SHORA, H.M.; METWALLY, M.; HABIB, S.A. Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of proteases. **Micróbios**, v. 86, n. 346, p. 59-69, 1996.

AZIZ, N. H.; YOUSSEF, Y. A.; EL-FOULY, M. Z.; MOUSSA, L. A. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, V. 39, p. 279-285, 1998.

BABU, P.S.; VAIDYA, A. N.; BAL, A.S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P.; RAJESH, K.; ASHA, J.. Kinetics of biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa strain BS2 from indústrial wastes. **Biotechnol. Letters, v.**18, n. 3, p. 263-268, 1996.

BADII, F.; MOSS, M. O. The effect of the fungicides tridemorph, fenprophimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. **Letters Applied Microbiology**, v. 7, p. 37-39, 1988.

BAJRACHARYA, R.; MUDGETT, R. E. Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. **Biotechnology Bioengineering**, v. 22, p. 2219-2235, 1980.

BE MILLER, J. N. An introduction to pectins: Structure and properties. In: Fishman, M. L.; Jem, J. J. (Eds), Chemistry and functions of pectins, ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington, D.C., 1986. (Apud) Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

BELDMAN, G.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEM, A. G. J.; PILNIK, W. Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquifaction and sacharification of biomass. **Enzyme Microbiology Biotechnology**, v. 6, p. 503-507, 1984.

BEN-GERA, I.; KRAMER, A. The utilization of food industries wastes. **Adv. Food Res.**, v. 17, p. 77-152, 1969.

BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.

BIRK, R; BRAVDO, B; SHOSEYOV, O. Detoxification of cassava by *Aspergillus niger* B-1. **Appl. Microbiol. Biotechn.**, v. 45, n. 3, p. 411-414, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 284-254, 1976.

BRESLER, G.; BRIZZIO, S. B.; VAAMONDE, G. Mycotoxin-produing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 101-108, 1995.

BUDIARSO, I. T.; CARLTON, W. W.; TUITE, J. The influence of some cultural conditions on toxigenicity of *Penicillium viridicatum*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 20, p. 194-205, 1971.

CAMPBELL, K. W.; WHITE, D. G. Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspegillus* ear rot, kernel infection and aflatoxin production. **Plant Disease**, v. 79, p. 1039-1045, 1995.

CANTO, W. L.; MENEZES, T. J. B. Produção, usos e mercado de enzimas. **In: Estudos econômicos - Alimentos processados. Ed Campinas: ITAL - Secretaria de Agricultura e Abastecimento - Coordenação de pesquisa agropecuária - ITAL**, n°29, 1995.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresourse Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CHEEKE, P. R. Mycotoxins associated with forages. In: CHEEK, P.R. (Ed), **Natural Toxicants in Feeds, Forages, and poisonous Plants**. Interstate Publishers Inc, Danville, IL, pag 243-274, 1998, **(Apud)** HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M.

Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

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*. **Rev. Microbiol.**, v. 26, n.4, p. 318-322, 1995.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic and fungalmetabolites**, Academic press, New York, 1981 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

CORDOVA, J.; NEMMAUORI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 75-78, 1998.

COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. Campinas, 1996, 202p. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. **UNICAMP**, Universidade Estadual de Campinas.

CROTTI, L. B.; JABOR, V. A. P.; CHELLEGATTI, M. A. S. C.; FONSECA, M. J.; SAID, S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **Journal Basic Microbiology**, v. 39, n4, p. 227-235, 1999.

DA SILVA, R.; FRANCO.; C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletin SBCTA**, v. 31, n.2, pág. 249-260, 1997.

DANTUR, N.; SCANDALIARIS, J.; PEREZ-ZAMORA, F.; RONCEDO, M. Agricultural utilization of residues from sugarcane agroindustry. 2. The use of vinasse. **Avance-AgroIndustrial**, v. 16, n. 64, p. 38-41, 1996.

DASILVA, E,; SASSON, A. Biotechnologies: an agenda for development. **Biotechn. Develop. Review.**,v. 4, p. 37-47, 1995.

DESCHAMPS, F.; HUET, M. C. Beta-glucosidase production in agitaded solid fermentation, study of its properties. **Biotechol. Letters**, v. 6, p. 451-456, 1984.

DETROY ,R.W.; HESSELTINE, C.W. Availability and utilization of agricultural and agroindústrial wastes. **Process Biochem**. v. 13, n. 9, p. 2-8, 1978.

DEVI, N. A.; RAO, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.59-65, 1996.

DHANDA, S.; GARCHA, H.S.; KAKKAR, V.K.; MAKKAR, G.S. Improvement in feed value of paddy straw by Pleurotus cultivation. **Mushroom Research**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 1996.

D'MELLO, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

D'MELLO, J. P. F.; PORTER, J. K.; MACDONALD, A. M. C.; PLACINTA, C. M. *Fusarium* mycotoxins. In: D'Mello, J. P. F. (Ed), **Handbook of Plant and Fungal Toxicans**. CRC Press, Boca Raton. P. 287-301, 1997. (Apud) D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

EATON, D. L.; RAMSDELL, H. S.; NEAL, G. E.Biotransformation of aflatoxins In: Eaton, J. D.; Groopman, J. D. (Eds), **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Sigificance**. Academic Press, San Diego, ÇÃ, p. 45-72, 1994 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F. Toxic effects of aflatixin B1 and Ochratoxin A, alone and in combination, on chicken embryos. **Bull. Enviromental Contamination Toxicology**, v. 36, p. 321-326, 1995, (Apud) Hussein, H. S.; Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

FALANGHE, H. Production of fungal mycelial protein in submerged culture of soybean whey. **Appl. Microbiol.**, v. 12, p. 330-334, 1964.

FARRAR, J. J.; DAVIS, R. M. Relationship among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. **Phytopathology**, v. 81, p. 661-666, 1991.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins their implications for human and animal health. **Vet. Q**, v. 21, p. 115-120, 1999 (Apud) Hussein, H. S.; Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

FONSECA, M. J. V.; SAID, S. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microb. Biotech.**, v. 11, p. 174-177, 1995.

FORGATY, W. M.; WARD, O. P. Pectinases and pectic polyssacharides. In: Hockenhull, D. J. D. (ed) **Progress in industrial microbiology. London: Churchill Livingstone**, v. 13, p. 59-119, 1974.

FRISVAD, J. C. A seletive and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 409-416, 1983.

GAREIS, M.; CEYNOWA, J. Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmoruin*. **Z. Lebensm. - Unters. Forsch**, v. 198, p. 244-248, 1994. (Apud) D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

GEKLE, M.; SCHWERDT, G.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; WILFLINGSEDER, D.; POLLACK, V.; DANDER, M.; SCHRAMEK, H. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

cells at nanomolar concentrations. **Journal Pharmacology Exp. Ther,** v. 293, p. 837-844, 2000.

GLAVITIS, R.; VANYI, A. more importat mycotoxicosis in pigs. **Magyar Allatorvosak Lapja, v.** 50, p. 407-420, 1995 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology,** v. 167, p. 101-134, 2001.

GRAJECK, W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 126-129, 1987.

GOMES, E.; IEMBO, T.; DA SILVA, R. Production, characterization and properties of polysaccharide depolymerizing enzymes from a strain of *Curvularia inaequalis*, **Folia Microbiol**, v.46, n.4, p. 303-308, 2001.

GONZALEZ-SISO, M.I.; SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology., v. 57, n.** 1, p. 1-11, 1996.

GUITIÉRREZ-ROJAS, M. S.; AURIAR, S.; REVAH, S.; BENET, J. C. (1997) A phenomenological model for solid state fermentation of fungal mycelial growth, p. 131-142. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Ed) **Advances in solid state fermentation.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. (APUD) SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid state fermentations. Cap 5, pag 61-79. In: Demain, A. L.;

Davies, J. E.(ed chief); **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. ASM Press, 2 ed, Washington, D.C. 1999.

GURUNG, N. K. RANKINS, D. L. JR; SHELBY, R. A.; GOEL, S. Effect of fumonisin B1 - contaminated feeds on weanling angora goats. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 2863-2870, 1998 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENGERDY, R.P. Mixed Culture Solid Substrate Fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on Sugar Cane Bagasse. **Bioresourse Technology**. V. 68, p. 173-178, 1999.

HANG, Y.D.; WOODANMS, E.E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. Lebensm. **Wiss. U. Techno.**, v. 27, p.194-196, 1994.

HARVEY, R.B.; HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; CORRIER, D. E.; PHILIPS, T. D. Progression of aflatoxicosis in growing barrows. **Am. Journal Veterinary Research**, v. 49, p. 482-487, 1988 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

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

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

HOLZAPFEL, W.H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 197-212, 2002.

HOURS, R. A.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. **Biological Wastes**, v. 23, p. 221-228, 1988.

HOURS, R. A.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid-state cultures. **Biological Wastes**, v. 24, p. 147-157, 1988.

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; DOERR, J. A. Mycotoxin interactionsin poultry and swine. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 2351-2355, 1988 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

IEMBO, T. **Estudo comparativo das enzimas (hemi)-celulolíticas de um fungo e uma levedura isolados**, Araraquara, 2000. 106 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Instituto de Química, **UNESP**, Universidade Estadual Paulista.

JANARDHANA, G. R.; RAVEESHA, K. A.; SHEKAR SHETTY, H. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). **Food and Cheical Toxicology**, v. 37, p. 863-868, 1999.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Biotransformation of tannic acid to gallic acid by solid state fermentation. In: PANDEY, A. (ed) **Advances in Biotechnology**. New Delhi: Educational Publishers, pag 67-74, 1998. (APUD) PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. A. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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

KETSA, S.; DAENGKANIT, T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, β-galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. **Scientia Horticulturae**, v. 80, p. 181-188, 1999.

KILARA, A. Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. **Process Biochemistry**, v. 23, p. 35-41, 1982.

KOLLER, A.; NEUKOM, H. **European Journal of Biochemistry**, v. 7, p. 485, 1969. **(APUD)** WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In; FORGATY, W. M.; KELLY, C. T. (ed)

unesp

Microbiol enzymes and biotechnology. 2 ed. London: Elsivier, cap. 4, p. 133-176, 1990.

KROG, P. Casual association of mycotoxic nephropathy. **Acta. Pathol. et Microbiol. Scand,** v. 269, pag, 1s-28s, 1978 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology,** v. 167, p. 101-134, 2001.

KROGH, P. Porcine neophropathy associated with ochratoxin A. In: Smith, J. E.; Anderson, R. A. (Eds) Mycotoxin and Animal Foods. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 627-645, 1991 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology,** v. 167, p. 101-134, 2001.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNApolymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal Molecular Biology,** v.76, p.103-122, 1973.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology,** v. 7, p. 258-265, 1985.

LÓPES-DIAZ, T. M.; ROMÁN-BLANCO, C.; GARCIA-ARIAS, M. T.; GARCIA-FÉRNANDEZ, M. C.; GARCIA-LÓPEZ, M. L. Mycotoxins in

two Spanish cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 391-395, 1996.

L'VOVA, L. S.; ORLOVA, N. YU.; OMEL'CHENKO, V. D. *Penicillium* molds produce ochratoxin A in grain. **Applied Bichemistry and Microbiology**, v. 28, n°6, p. 692-695, 1993.

MACMILLAN, J. D.; SHEIMAN, M. I. Pectic enzymes. In: Whitaker, J. R. (ed) **Food related enzymes. Washington: ACS**, p. 101-130, 1974.

MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido.** São Paulo, 1990, 165p. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Escola Politécnica, **USP**, Universidade de São Paulo. (Apud) Rizzatto, M. L. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado**, Campinas, 1999. 89 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, **UNICAMP**, Universidade Estadual de Campinas.

MARTINS. E.S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiascus* **Process Biochemistry**, v.37, p.949-954, 2002.

MERTENS, D. R. Biologicl effects of mycotoxins upon rumen fermentation and lactating daiary cows. In: **Interactions of Mycotoxins in Animal Production**. National Academic Press, p. 118-136, 1979 (Apud) Hussein, H. S.; Brasel, J.

M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology, v.** 167, p. 101-134, 2001.

MILLER, G.L. Use of dinitrolssalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLS, J. T.; SEIFERT, K. A.; FRISVAD, J. C.; ABRAMSON, D. Nephrotoxigenic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada. **Mycopathologia**, v. 130, pags. 23-28, 1995.

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC nº 274, 15 de Outubro de 2002 **(in)** www. anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm, acessado em 6/12/2002

MIRAGLIA, M.; DOMINICIS, A. DE; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MENGHETTI, E.; MIRAGLIA, E. Ochratoxin A levels in humam milk and related foods samples: an exposure assessment. **Natural Toxins, v.** 3, p. 436-444, 1995.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Bichemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A.; GREENFIELD, P. F.; DOELLE, H. W. Mode of growth of *Rhizopus oligosporus* on a model substrate in solid-state fermentation. **World Journal Microbiol. Biotechnology**, v. 6, p. 201-208, 1990.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. **Definition, Characteristics and Potential**, cap I, p. 1-16. In: Doelle, H. W.; Mitchell, D. A.; Rolz, C. E. (ed.) **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TERGERDY, R. P. Principles of solid substrate fermentation. In: Filamentous Fungi, v. 4, ed J. F. Smith, D. R. Berry, B. Kristiansen. Edward Arnold, London, p. 117-144, 1983 (APUD) MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. **Definition, Characteristics and Potential**, cap I, p. 1-16. In: Doelle, H. W.; Mitchell, D. A.; Rolz, C. E. **(editores) Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

MOTARJEMI, Y. Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 213-229, 2002.

OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of cofee pulp

and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-162, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresourse Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000b.

PARKIN, K. L. Enviromental effects on enzyme activity In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. (Eds), **Enzymes in food processing**. Academic Press, INC, 3rd ed., p. 39-69, 1993.

PATHAK, N.; SANWAL, G. G. Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. **Phytochemistry**, v. 48, n 2, p. 249-255, 1998.

PIFFERI, P. G.; BUSKA, G.; MANENTI, I.; LO PRETI, A.; SPAGNA, G. Immobilization of pectinesterase on γ-alumina for the treatament of juices. Belgian **Journal Food Chemistry Biotechnology**, v. 44, p. 173-182, 1989.

PILNIK, W., VORAGEN, A. G. J. Pectic enzymes in fruit juice and vegetable manufacture. In: Reeds, G. (Ed), **Food and Science Technology, Enzymes in Food Processing**. Academic Press, New York, p. 363-399, 1993.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F. M. Pectic enzymes. In: Birch, G. C.; Blakebrough, N.; Parker, K. J. (ed) **Enzymes in food processing**. London: Applied Science Publishers, p. 105-128, 1981.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, A. G. J. On the classification of pectin depolymerases:Activity of pectin depolymerases on glycol esters of pectato as new classification criterion. **Chemical Microbiol. Technol.** V.2, p.122-128, 1973.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum,* and productionn of ochratoxin A. **Applied and Enviromental Microbiology, v.** 53, n°2, p. 266-269, 1987.

POHLAND, A. E. Studies concerning the methabolites produced by *Stachibotrys atra, Penicillium islandicum, Penicillium viridicatum and Aspergillus versicolor.* **Annales de la Nutrition at de L'alimentation,** n°31, p. 663-684, 1977.

QUIST, C. F.; HOWERTH, E. W.; FISCHER, J. R.; WYATT, R. D.; MILLER, D. M.; NETTLES, V. F. Evaluation of low-level aflatoxin inthe diet of white-tailed deer. **Lournal Wildlife Disease, v.** 33, p. 112-121, 1997 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology, v.** 167, p. 101-134, 2001.

RAMOS, A. J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology, v.** 44, pag 133-140, 1998.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MRACKOVÁ, M.; LUKNÁR, D.; KOHN, R. The role of secondary alcoholic groups of D-galacturonan in its degradation by endo-D-galacturonase. **Coll. Czech. Chem. Commum.** V.42, p.3204-3213, 1977 **(Apud)** NAGODAWITHANA, T.; REED, G. (Eds), **Enzymes in food processing.** Academic Press, INC, 3rd ed., p. 363-399, 1993.

RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado,** Campinas, 1999. 89 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, **UNICAMP**, Universidade Estadual de Campinas.

SANGSURASAK, P.; NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D. A. Mathematical modeling of the growth of filamentous fungi in solid state fermentation. **Journal Science Industrial Res.**, v. 55, p. 333-342, 1996.

SARRETTE, M.; NOUT, M. J. R.; GERVAIS, P.; ROMBOUTS, F. M. Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnology, v.** 37, n.4, p. 420-425, 1992.

SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid state fermentations. Cap 5, pag 61-79. In: Demain, A. L.; Davies, J. E.(ed); **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** ASM Press, 2 ed, Washington, D.C. 1999.

SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B. K.; NAVARRO, J.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a columnfermentor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 580-582, 1992.

SCOTT, P. M. The natural occurrence of trichothecenes. In Beasley, V.D. (ed), **Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiology Effects**, V. 1 CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-26, 1989 (Apud) D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

SERRA, J. L.; ALKORTA, I.; LLAMA, M. J.; ALÑA, A. Aplication industrial de los enzimas pécticos. Production, purification, imovilization y algunas propriedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*. **Alimentación.Equipos y Tecnología**, v. 11, p. 127-134, 1992.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production from *Penicillium viridicatum* rfc3 by solid state fermentation using agricultural residues and agro-industrial by-product. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2002 (in press).

SINGH, K.; PUNIYA, K.; SINGH, S. Biotrasnformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation. **Journal Science Ind. Res.**, v. 55, p. 472-478, 1999.

SMITH, J. E.; ROSS, K. The toxigenic Aspergilli. In: SMITH, J. E.; ANDERSON, R. A. (Eds.), **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 101-118, 1991 (Apud) Hussein, H. S.; Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Fruit flavor production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee rusk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 857-861, 2000.

SOLÍS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the syntesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 36-41, 1993.

TAKEBE, I.; OTSUKI, Y.; AOKI, S. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. **Plant Cell Physiology**, v. 9, pag 115, 1968, (Apud) Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

THIEMANN, J. E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referências as celulases. In: SEMINÁRIO DE "HIDROLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS", 2, 1985, Maringá. Anais...Maringá, p. 1077-31, 1985. (Apud) RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus***

niger NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado, Campinas, 1999. 89 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, **UNICAMP**, Universidade Estadual de Campinas.

TONG, C; DRAUGHON, F. A. Inhibition by antimicrobial food additives of Ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus and Penicillium viridicatum*. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 49, n°6, p. 1407-1411, 1985.

TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. **Biotechnology and Bioeng. Symp.** N 6, p. 207-219, 1976.

TREJO-HERNANDEZ, M. R.; ORIOL, E.; LOPEZ-CANALES, A.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA, G.; RAIMBAULT, M. Prodiction of pectinases by *Aspergillus niger* by solid state fermentation on support. **Micol. Neotrop. Appl.**, v. 4, p. 49-62, 1991.

TREVELYAN, W. E. The enrichment of cassava by moist-solids fermentation. **Tropical Science**, v. 16, p. 179-194, 1974.

UPDEGRAFF,D.M. _____. The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum distilling industries. **Dev. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 317-324, 1973.

VAILLANT, F.; MILLAN, P.; O´BRIEN, G.; DORNIER, M.; DECLOUX, M.; REYNES, M. Crossflow microfiltration of

passion fruit juice after partial enzymatic liquefation. **Journal of Food Engineering**, v.42, p.215-224, 1999.

VANDERBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the syntesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresourse Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Apergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.

VARZAKAS, T. H.; PYLE, D. L.; NIRANJAM, K. (1997) Mycelial penetration and enzymic difusion on soybean tempe, p. 59-70. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Ed) **Advances in solid-state fermentation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

VILLEGAS, E.; REVAH, S.; AUBAGUE, S.; ALCANTARA, L.; AURIA, R. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO_2 and O_2 enviroments. **Biotechnologies Advances**, v. 11, p. 387-397, 1993.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorimetric detection: collaborative study. **Journal of AOAC International**, vol 84, n° 6, 2001.

WEI, Y. H.; LU, C. Y.; LIN, T. N.; WEI, R. D. Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. **Toxycology, v.** 36, p. 119-130, 1985 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

WEST, S. Olive and other edible oils. In: Godfrey, T.; West, S. (Eds), Industrial Enzymology, 2°ed, Stockholm Press, p. 293-300, 1996. (Apud) Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In; FORGATY, W. M.; KELLY, C. T. (ed) **Microbiol enzymes and biotechnology**. 2 ed. London: Elsivier, cap. 4, p. 133-176, 1990.

WINKLER, M. Limitation of fermentation processes for utilization of food wastes. **Topics Enz. Ferment. Biotechnol.**, v. 7, p. 271-306, 1983.

WOGAN, G. N. Chemical nature and biological effects of the afatoxins. **Bacteriology Review**, v. 2, pag 460-470, 1966.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (WHO - IARC). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 445-462, 1993a

WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Toxins derived from *Fusarium moniliforme:* fumonisins B1 and B2 and fusarin C. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 445-462, 1993b.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from xilose industry. **Process Biochemistry**, v.34, p. 909-912, 1999.

XIAO, H.; SRINIVASA, M.; MARQUARD, R. R.; LI, S.; VODELA, J. K.; FROHLICH, A. A.; KEMPPAINEN, B. W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form, and several its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology Applied Pharmacology, v.** 37, p. 182-192, 1996 (Apud) HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology, v.** 167, p. 101-134, 2001.

XI - APENDICE

Tabela 1A: Produção da Exo-poligalacturonase (U/mL) cultivada em sacos de polipropileno (S) e Erlenmeyers (E) hidratados a 70 e 80% de umidade por 336 horas.

EXO-PG	EXPERIMENTO	48h	96h	144h	192h	240h	288h	336h
70% UMIDADE	**1S**	1,8	0	2,4	3	0,6	3,5	10,5
	2S	3,2	1,2	0,6	12,6	2,4	5,4	3
	3S	0,7	1,2	1,4	2,1	4	8,4	15,2
	1E	3	3	3,6	1,8	5,4	8,5	8,5
	2E	4,4	8,4	7,8	12	1,8	2,4	1,8
	3E	1,1	2,2	2,7	2,5	4,8	5,6	13,2
80% UMIDADE	**1S**	0	1,2	1,2	2,6	5,2	7,4	7,2
	2S	0,6	2,6	0,6	3,6	8,4	6,5	2
	3S	1,4	0,3	0,9	1,8	5,4	13,6	17,6
	1E	0,5	0,4	0,5	5,3	11,2	11,6	15,6
	2E	1,8	1,8	1,8	13,2	6,6	12,6	14
	3E	0	1,2	3,5	3	7,6	22	22

Tabela 2A: Produção da Pectina liase (U/mL) cultivada em sacos de polipropileno (S) e Erlenmeyers (E) hidratados a 70 e 80% de umidade por 336 horas.

PL	EXPERIMENTO	48h	96h	144h	192h	240h	288h	336h
	1S	143	0	0	0	0	459	428
	2S	0	122	305	0	184	0	102
70%	**3S**	124,2	0	164	0	0	0	100
UMIDADE	**1E**	0	61	0	0	642	244	428
	2E	0	244	0	0	0	51	76
	3E	0	0	174	79,5	0	0	268
	1S	30,5	0	61	336	0	0	76
	2S	143	0	0	0	0	452	427
80%	**3S**	49,7	104	0	124	0	0	0
UMIDADE	**1E**	153	61	336	0	122,18	101,82	0
	2E	0	62	0	0	641,45	244,36	427,63
	3E	64,6	0	293	37,8	0	89,5	79,5

Tabela 3A: Produção da Endo-poligalacturonase (U/mL) cultivada em sacos de polipropileno (S) e Erlenmeyers (E) hidratados a 70 e 80% de umidade por 336 horas.

Endo-PG	EXPERIMENTO	48h	96h	144h	192h	240h	288h	336h
70% UMIDADE	**1S**	2,98	3,3	3,15	3,09	3,53	5,1	5,1
	2S	0,74	3,07	3,07	7,19	8,15	5,64	7,89
	3S	2,04	8,82	7,52	7,15	6,3	5,28	4,93
	1E	7,82	4,24	3,4	3,56	3,5	4,7	5,31
	2E	4,97	5,77	6,03	9,97	8,53	7,54	8,05
	3E	4,15	6,23	6,38	7,39	6,21	5,7	6,77
80% UMIDADE	**1S**	2,3	1,27	3,55	3,37	3,6	5,36	5,44
	2S	2,13	3,55	5,36	6,8	9,4	7,95	8,09
	3S	1,2	1,18	1,36	1,32	1,35	1,44	1,42
	1E	2,54	2,13	3,72	3,72	3,6	5,36	5,4
	2E	2,71	3,82	5,88	9,95	10,08	8,21	8,24
	3E	1,2	1,47	1,5	0,88	1,48	1,36	1,48

Tabela 1B: Síntese do processo de extração do suco de banana através do uso de pectinases.

Ensaio	Vol. Extraído (mL)	Peso Úmido (g)	Abs. 660nm	Rend. (mL/g)	Rend Rel. Controle (%)
AN1	**7,8◊**	**5,54**	**0,52**	**0,52**	
	11	5,83	0,36	0,73	141,02
	12	5,3	0,41	0,80	153,80
	12	5,16	0,39	0,80	153,80
AN2	**6**	**4,94**	**0,51**	**0,40**	
	12	5,61	0,48	0,80	200
	13	4,49	0,43	0,86	216
	12	4,41	0,43	0,80	200
ON1	**5,4**	**6,5**	**0,52**	**0,36**	
	14,2	4,96	0,48	0,94	262,96
	11,2	5,22	0,47	0,75	207,40
	11,4	5,75	0,50	0,76	211,11
ON2	**7**	**5,89**	**0,50**	**0,46**	
	13	4,7	0,48	0,86	185,71
	12,4	5,05	0,49	0,83	177,14
	12,2	5,05	0,48	0,81	174,28
AO1	**5,8**	**6,61**	**0,51**	**0,38**	
	13,4	4,32	0,46	0,89	231,03
	12	4,5	0,44	0,80	206,90
	11,5	4,92	0,41	0,76	198,27
AO2	**6**	**6,2**	**0,52**	**0,41**	
	14,4	4,19	0,46	0,96	232,25
	13,4	4,25	0,40	0,89	216,13
	12,4	4,45	0,43	0,82	200
OO1	**5,2**	**6,74**	**0,52**	**0,34**	
	15,4	4,01	0,48	1,02	296,15
	12,8	4,32	0,47	0,85	246,15
	12	4,62	0,46	0,80	230,76
OO2	**7,8**	**6,42**	**0,53**	**0,52**	
	14,6	3,66	0,43	0,97	187,18
	14	4,40	0,42	0,93	179,50
	12	4,35	0,44	0,80	153,84

A: Temperatura ambiente, O: Condições Ótimas (pH ou Temperatura) N: pH natural, 1 ou 2: Tempo Ação Enzima, ◊**controle**

unesp

Tabela 2B: Síntese do processo de extração do suco de maçã através do uso de pectinases.

Ensaio	Vol. Extraído (mL)	Peso Úmido (g)	Abs. 660nm	Rend. (mL/g)	Rend Rel. Controle (%)
AN1	**8◊**	**7,2**	**0,14**	**0,53**	
	9	6,31	0,05	0,6	112,5
	9	6,76	0,03	0,6	112,5
	10	7,39	0,04	0,66	125
AN2	**9**	**6,75**	**0,17**	**0,6**	
	10,1	5,97	0,05	0,66	111
	12	6,91	0,05	0,80	133
	10	6,26	0,04	0,66	111
ON1	**10**	**6,26**	**0,29**	**0,66**	
	11	4,85	0,03	0,73	110
	11	5,28	0,02	0,73	110
	12	4,56	0,21	0,80	120
ON2	**11**	**5,51**	**0,17**	**0,73**	
	12	4,33	0,05	0,80	109
	12	4,20	0,03	0,80	109
	14	5,37	0,02	0,93	127,3
AO1	**8**	**7,17**	**0,62**	**0,53**	
	10	6,63	0,14	0,66	125
	9	7,29	0,27	0,60	112,5
	13	7,08	0,35	0,86	162,5
AO2	**10**	**5,35**	**0,36**	**0,66**	
	11	6,22	0,28	0,73	110
	14	4,59	0,34	0,93	140
	14	5,07	0,34	0,93	140
OO1	**11**	**6,04**	**0,27**	**0,73**	
	11	4,77	0,21	0,73	100
	13	4,62	0,24	0,86	118
	13	5,31	0,26	0,86	118
OO2	**10**	**4,64**	**0,35**	**0,66**	
	14	4,61	0,31	093	140
	16	4,44	0,33	1,06	160
	13	4,82	0,30	0,86	130

A: Temperatura ambiente, O: Condições Ótimas (pH ou Temperatura) N: pH natural, 1 ou 2: Tempo Ação Enzima, ◊**controle**

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 3B: Síntese do processo de extração do suco de cenoura através do uso de pectinases.

Ensaio	Vol. Extraído (mL)	Peso Úmido (g)	Abs. 660nm	Rend. (mL/g)	Rend Rel. Controle (%)
AN1 = AO1	**7°**	**11,1**	**0,41**	**0,46**	
	9	11,35	0,15	0,6	129
	7	10,76	0,11	0,47	100
	8	11,40	0,08	0,53	114
AN2 = AO2	**7**	**11,76**	**0,49**	**0,47**	
	7	11,32	0,10	0,47	100
	7	11,68	0,08	0,47	100
	7	11,30	0,09	0,47	100
ON1 = OO1	**8**	**9,35**	**0,45**	**0,53**	
	9	9,67	0,06	0,60	112,5
	9,5	9,25	0,06	0,63	119
	9	9,79	0,07	0,60	112,5
ON2 = OO2	**9**	**9,26**	**0,54**	**0,6**	
	11	9,36	0,10	0,73	122
	9	9,69	0,08	0,47	78
	7	9,44	0,09	0,60	100

A: Temperatura ambiente, O: Condições Ótimas (pH ou Temperatura) N: pH natural, 1 ou 2: Tempo Ação Enzima,
°**controle**

Tabela 4B: Síntese do processo de extração do suco de banana através do uso das frações de pectinases separadas em sephadex G-50 por 2 horas a 50°C.

Ensaio	Vol. Extraído (mL)	Peso Úmido (g)	Abs. 660nm	Rend. (mL/g)
Controle	5	4,78	0,20	1,04
	6	5,70	0,07	1,05
	10	5,56	0,09	1,79
	12	5,46	0,15	2,19
Exo-PG III	13	5,45	0,20	2,38
	10	6,70	0,15	1,49
	10	7,10	0,09	1,40
	10	6,18	0,10	1,61
Endo-PG II	15	5,69	0,05	2,63
	12	6,51	0,10	1,84
	10	6,68	0,22	1,49
	9,5	6,62	0,11	1,43
PL I	13	5,83	0,11	2,23
	10	5,35	0,21	1,87
	10	7,65	0,20	1,30
	12	5,66	0,17	2,12

unesp

Tabela 5B: Síntese do processo de extração do suco de maçã através do uso das frações de pectinases separadas em sephadex G-50 por 2 horas a 50°C.

Ensaio	Vol. Extraído (mL)	Peso Úmido (g)	Abs. 660nm	Rend. (mL/g)
Controle	13	5,48	0,09	2,37
	10	7,32	0,12	1,36
	11	6,93	0,15	1,58
	11	7,20	0,10	1,52
Exo-PG III	16	8,40	0,08	1,90
	11	6,12	0,12	1,79
	11	6,40	0,10	1,72
	11	6,33	0,16	1,73
Endo-PG II	11	6,79	0,18	1,62
	10	6,95	0,15	1,43
	13	5,53	0,16	2,35
	11	6,62	0,14	1,66
PL I	16	7,40	0,09	2,16
	11	6,35	0,13	1,73
	11	6,50	0,13	1,69
	11	8,25	0,12	1,69

unesp