

Eduardo da Silva Martins

Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico
Thermoascus aurantiacus através de fermentação em
estado sólido utilizando resíduos agro-industriais



1910001179



Eduardo da Silva Martins

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PELO FUNGO
TERMOFÍLICO *Thermoascus aurantiacus* ATRAVÉS DE
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2003



1.1.179/03

577.15
M386p

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
IBILCE - Câmpus São José do Rio Preto



Eduardo da Silva Martins

PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PELO FUNGO
TERMOFÍLICO *Thermoascus aurantiacus* ATRAVÉS DE
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS

Martins, Eduardo da Silva.

Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico
Thermoascus aurantiacus através de fermentação em estado sólido
utilizando resíduos agro-industriais – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
130 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 termofílicos. 5. Enzimas - Aplicações industriais. 6. Pectinase.
I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.1

Eduardo da Silva Martins

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PELO FUNGO
TERMOFÍLICO *Thermoascus aurantiacus* ATRAVÉS DE
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Profa. Dra. Eleni Gomes

Orientadora

Prof. Dr. Ranulfo Monte-Alegre

2º Examinador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

3º Examinador



DADOS CURRICULARES***Eduardo da Silva Martins***

Nascimento: 04/03/1978 – Frutal – MG

Filiação Jair Lemes Martins
 Maria Helena da Silva Martins

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



***Aos meus pais e
irmãos, pelo apoio
e dedicação de uma
vida.***



AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só foi possível graças ao apoio que recebi em todos os momentos, alegres ou difíceis. Por isso, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização:

Aos meus pais, que não mediram esforços para que eu vencesse mais esta etapa.

Aos meus irmãos, pela amizade e por compartilhar comigo todos os momentos.

Aos meus avós, especialmente à avó Alicia (*in memoriam*), pela bela lição de vida que representou a todos.

À Luciana, pelo carinho e incentivo.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, pela valiosa orientação desde a minha iniciação científica, o que muito contribui para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo esclarecimento das dúvidas e agradável convívio no laboratório.

A todos os colegas de laboratório, pelos agradáveis momentos durante os últimos anos: Alessandra, Ana Paula, Carla, Caio, Dênis, Daniela, Gisele, Heloíza, Kívia, Márcia M., Márcia R., Maricy, Natália, Rodrigo, Simone, Solange, Tatiane, Tony e Valquíria.

Ao Rodrigo, pelo uso do computador, pelo convívio durante o mestrado e principalmente pela amizade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A Deus, por tudo.



ÍNDICE

Páginas

Introdução 1

1. O homem e o sonho 1

2. O homem e o sonho 1

3. O homem e o sonho 1

4. O homem e o sonho 1

5. O homem e o sonho 1

6. O homem e o sonho 1

7. O homem e o sonho 1

8. O homem e o sonho 1

9. O homem e o sonho 1

10. O homem e o sonho 1

11. O homem e o sonho 1

12. O homem e o sonho 1

13. O homem e o sonho 1

14. O homem e o sonho 1

15. O homem e o sonho 1

16. O homem e o sonho 1

17. O homem e o sonho 1

18. O homem e o sonho 1

19. O homem e o sonho 1

20. O homem e o sonho 1

**"O homem faz de si a
imagem de seus sonhos"**
Helena Blavatski

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
I- RESUMO	1
II- ABSTRACT	3
III- INTRODUÇÃO	5
IV- OBJETIVOS GERAIS	8
V- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1- Substâncias pécicas	9
2- Enzimas pécicas.....	10
2.1- Protopectinases	11
2.2- Enzimas desesterificantes.....	11
2.2.1- Pectinesterases	11
2.3- Enzimas despolimerizantes.....	12
2.3.1- Hidrolases	12
2.3.1.1- Poligalacturonases.....	12
2.3.1.2- Polimetilgalacturonases	12
2.3.2- Liasas.....	13
2.3.2.1- Polimetilgalacturonato liases (pectina liases)	13
2.3.2.2- Poligalacturonato liases (pectato liases).....	14
3- Fermentação em estado sólido e utilização de resíduos agro-industriais na produção de enzimas microbianas	14
3.1- Histórico.....	14
3.2- Características gerais da fermentação em estado sólido	15
3.3- Vantagens da fermentação em estado sólido	16
4- Aplicação das pectinases na indústria de alimentos	18
5- Produção de pectinases microbianas.....	20
6- Produção de pectinases por microrganismos termofílicos	24
6.1- Adaptações moleculares da termofilia	27

VI- CAPÍTULO I: SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO FUNGO <i>Thermoascus aurantiacus</i> ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	31
1- INTRODUÇÃO	31
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1- Microrganismo	35
3.2- Meios de cultivo	35
3.2.1- Meio de manutenção	35
3.2.2- Meio para a fermentação e obtenção das enzimas.....	35
3.3- Fermentação em estado sólido.....	35
3.4- Umidade do substrato.....	36
3.5- Medida da atividade enzimática	36
3.5.1- Atividade de poligalacturonase (PG).....	36
3.5.2- Atividade de pectina liase (PL)	36
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1- Produção de pectina liase e poligalacturonase em farelo de trigo e em misturas de bagaço de cana e farelo de trigo	38
4.2- Produção de pectina liase e poligalacturonase em bagaço de laranja e em misturas de bagaço de cana e de laranja	44
 VII- CAPÍTULO II: EFEITOS DE DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES E DO TEMPO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE E PECTINA LIASE EM FRASCOS ERLLENMEYER E EM EMBALAGEM DE POLIPROPILENO.....	 51
1- INTRODUÇÃO	51
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3- MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1- Microrganismo	54
3.2- Estudo da suplementação do meio com nutrientes.....	54
3.3- Recipientes de fermentação.....	54
3.4- Fermentação em estado sólido	55
3.5- Umidade do substrato.....	55
3.6- Planejamento experimental para o estudo dos fatores solução nutriente e tempo de cultivo.....	55
3.7- Medida da atividade enzimática	66
3.7.1- Atividade de poligalacturonase (PG).....	56
3.7.2- Atividade de pectina liase (PL)	56



4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1- Produção das enzimas em frascos Erlenmeyer.....	57
4.1.1- Poligalacturonase.....	57
4.1.2- Pectina liase.....	63
4.2- Produção das enzimas em embalagem de polipropileno	66
4.2.1- Poligalacturonase.....	66
4.2.2- Pectina liase	69

VIII- CAPÍTULO III: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS

NA PRODUÇÃO DAS PECTINASES	74
1- INTRODUÇÃO	74
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	77
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3.1- Microrganismo.....	78
3.2- Fermentação em estado sólido (FES)	78
3.3- Planejamento experimental para o estudo de fatores físico-químicos	79
3.4- Medida da atividade enzimática	79
3.4.1- Atividade de poligalacturonase (PG).....	79
3.4.2- Atividade de pectina liase (PL)	80
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1- Poligalacturonase.....	81
4.2- Pectina liase	89

IX- CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PECTINASES

E ESTUDO DO PERFIL ENZIMÁTICO	96
1- INTRODUÇÃO	96
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	98
3- MATERIAL E MÉTODOS	99
3.1- Microrganismo.....	99
3.2- Inóculo, suplemento de nutrientes e hidratação	99
3.3- Caracterização físico-química das pectinases	99
3.3.1- Determinação do pH e temperatura ótimos	99
3.3.2- Determinação da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH	100
3.4- Estudo do perfil enzimático.....	100
3.5- Medida da atividade enzimática	100
3.5.1- Atividade de Poligalacturonase (PG).....	100
3.5.2- Atividade de Pectina liase (PL)	101

3.5.3- Atividade de Xilanase	101
3.5.4- Atividade de Avicelase e CMCase.....	102
3.5.5- Atividade de Amilase	102
3.5.6- Atividade de Lacase	102
3.5.7- Atividade de Manganês-peroxidase.....	103
3.5.8- Atividade de Lignina-peroxidase	103
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.1- Determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas	104
4.2- Determinação da temperatura ótima para a atividade das enzimas.....	105
4.3- Determinação da estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura.....	107
4.4- Estudo do perfil enzimático	112
X- CONCLUSÕES	118
XI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120



LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Estrutura da molécula de pectina.....	10
Figura 2: Pontos de ataque das pectinases na molécula de pectina.....	11
Figura 3: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES, em farelo de trigo. -■- PG; -□- PL.....	39
Figura 4: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por 10% de bagaço de cana e 90% de farelo de trigo. -■- PG; -□- PL.....	40
Figura 5: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por 30% de bagaço de cana e 70% de farelo de trigo. -■- PG; -□- PL.....	41
Figura 6: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por 40% de bagaço de cana e 60% de farelo de trigo. -■- PG; -□- PL.....	42
Figura 7: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por bagaço de laranja. -■- PG; -□- PL.....	45
Figura 8: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por 10% de bagaço de cana e 90% de bagaço de laranja. -■- PG; -□- PL.....	46
Figura 9: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por 30% de bagaço de cana e 70% de bagaço de laranja. -■- PG; -□- PL.....	47
Figura 10: Produção de pectinases por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES de substrato composto por 40% de bagaço de cana e 60% de bagaço de laranja. -■- PG; -□- PL.....	48



- Figura 11:** Produção média de poligalacturonase por *Thermoascus aurantiacus* em Erlenmeyer, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias..... 59
- Figura 12:** Produção média de pectina liase por *Thermoascus aurantiacus* em Erlenmeyer, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias..... 64
- Figura 13:** Produção média de poligalacturonase por *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias..... 67
- Figura 14:** Produção média de pectina liase por *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias..... 71
- Figura 15:** Efeito do pH sobre a atividade das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES, em meio contendo 30% de bagaço de cana e 70% de bagaço de laranja. Tampões: acetato 2,5-5,5; citrato 5,5-7,0; tris-HCl 7,0-8,5; Glicina 8,5-11,5.
-■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -o- PL após otimização 105
- Figura 16:** Efeito da temperatura sobre a atividade das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* em FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja.
-■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização;
-●- PL antes da otimização; -o- PL após otimização.
Tempo de pré-incubação: 10 minutos para PG e 30 minutos para PL..... 107

Figura 17: Estabilidade das pectinases produzidas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de FES, frente às variações de pH, em ausência de substrato.

- PG antes da otimização; -□- PG após otimização;
- PL antes da otimização; -o- PL após otimização.

Tempo de pré-incubação: 24 horas..... 108

Figura 18: Estabilidade à temperatura das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES por 1 hora, em diferentes temperaturas.

- PG antes da otimização; -□- PG após otimização;
- PL antes da otimização; -o- PL após otimização.....

109

Figura 19: Estabilidade das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES quando expostas a 60°C, por diferentes períodos. -■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -o- PL após otimização

110



LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Produção de poligalacturonase e pectina liase em farelo de trigo e nas diferentes misturas de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar	42
Tabela 2: Produção de poligalacturonase e pectina liase em bagaço de laranja e nas diferentes misturas de bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar.....	48
Tabela 3: Tratamentos aplicados no experimento fatorial 2x7	56
Tabela 4: Produção média de poligalacturonase por <i>Thermoascus aurantiacus</i> em Erlenmeyer, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias	58
Tabela 5: Análise de variância da produção de poligalacturonase em Erlenmeyer em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C.....	60
Tabela 6: Teste de Tukey para as médias de produção da poligalacturonase em Erlenmeyer em relação aos fatores tempo de incubação e solução nutriente.....	61
Tabela 7: Produção de pectina liase em Erlenmeyer pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> em FES no experimento fatorial 2x7	63
Tabela 8: Análise de variância da produção de pectina liase em Erlenmeyer em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C, no tempo de 10 dias.....	65
Tabela 9: Teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase em Erlenmeyer	65
Tabela 10: Produção de poligalacturonase em embalagem de polipropileno pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> em FES no experimento fatorial 2x7.....	66



Tabela 11: Análise de variância da produção de poligalacturonase em embalagem de polipropileno em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C	68
Tabela 12: Teste de Tukey para as médias dos fatores tempo de incubação e solução nutriente	69
Tabela 13: Produção de pectina liase em embalagem de polipropileno pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> em FES no experimento fatorial 2x7	70
Tabela 14: Análise de variância da produção de pectina liase em embalagem de polipropileno em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C	72
Tabela 15: Teste de Tukey para as médias do fator solução nutriente	72
Tabela 16: Tratamentos aplicados no experimento fatorial 3x2x2	79
Tabela 17: Produção de poligalacturonase pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> em FES no experimento fatorial 3x2x2, na combinação de diferentes fatores físico-químicos.....	81
Tabela 18: Análise de variância da produção de poligalacturonase em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), em diferentes condições de pH, umidade e temperatura de incubação	82
Tabela 19: Teste de Tukey para as médias de produção de poligalacturonase nos diferentes fatores físico-químicos estudados	83
Tabela 20: Desdobramento do fator temperatura de incubação dentro do fator pH inicial do substrato	84
Tabela 21: Teste de Tukey para as médias no fator temperatura de incubação dentro de cada valor de pH inicial do substrato.....	84
Tabela 22: Desdobramento do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação	87
Tabela 23: Teste de Tukey para médias do fator umidade dentro de cada temperatura de incubação	87



Tabela 24: Produção média de pectina liase pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> em FES no experimento fatorial 3x2x2, na combinação de diferentes fatores físico-químicos.....	89
Tabela 25: Análise de variância da produção de pectina liase em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), em diferentes condições de pH, umidade e temperatura de incubação	90
Tabela 26: Teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase nos diferentes fatores físico-químicos estudados.....	92
Tabela 27: Desdobramento do fator temperatura de incubação dentro do fator pH	93
Tabela 28: Teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase em cada temperatura de incubação do fungo	93
Tabela 29: Desdobramento do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação	94
Tabela 30: Teste de Tukey para as médias do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação.....	95
Tabela 31: Perfil enzimático produzido pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> em meio composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja	113



I- RESUMO

O processo de fermentação em estado sólido tem sido adequadamente empregado para a produção de diversos tipos de enzimas microbianas, além de ser um processo simples, de baixo custo e que geralmente proporciona um alto rendimento. As pectinases são enzimas que apresentam uma ampla aplicação industrial, sendo utilizadas principalmente no processamento de sucos e pastas vegetais. Estas também são usadas em processos nos quais é necessária a eliminação da pectina, como na produção de vinho, no processamento de café e chás e na indústria têxtil.

Este trabalho apresenta a produção de exo-poligalacturonase e pectina liase pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* por fermentação em estado sólido de diferentes resíduos agro-industriais. Alguns parâmetros fermentativos, como recipiente de fermentação (frascos Erlenmeyer e embalagem de polipropileno), pH (5,0, 5,5 e 6,0), umidade inicial do substrato (70% e 80%) e temperatura de incubação (50°C e 55°C) foram avaliados, visando o aumento na produção das pectinases. Foram também avaliados seis tipos diferentes de soluções nutrientes como suplemento do substrato. Além disso, foi feita a caracterização físico-química das enzimas e avaliado o perfil enzimático produzido pelo fungo.

No início dos ensaios, a fermentação ocorreu durante um período de 14 dias. O substrato escolhido para a produção das enzimas foi à base de bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja, na proporção de 30%/70% (p/p). As condições que proporcionaram a maior produção de poligalacturonase foram: 4 dias de fermentação, cultivo em frascos Erlenmeyer, pH inicial 5,0, umidade inicial de 70% e temperatura de crescimento de 50°C. Já para a pectina liase, as melhores condições foram: 10 dias de fermentação, cultivo em embalagem de polipropileno, pH inicial 5,0, umidade inicial de 70% e temperatura de crescimento de 50°C.

A solução nutriente mais apropriada para a produção de ambas as enzimas foi a composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%.

As pectinases obtidas mostraram-se bastante termoestáveis, mantendo mais de 80% da atividade por 1 hora a 60°C e também apresentaram estabilidade em uma ampla faixa de pH.

Os resultados obtidos mostraram que o fungo *Thermoascus aurantiacus* também apresenta um grande potencial de produção de outras enzimas hidrolíticas, como carboximetilcelulase, xilanase e ligninases. A produção destas enzimas, além das pectinases, mostra que este microrganismo apresenta um grande potencial de produção de complexos enzimáticos, os quais podem ser aplicados em diferentes processos industriais.



II- ABSTRACT

The solid state fermentation process has been adequately employed for many microbial enzymes production, besides being a simple process, of low cost and generally provides high yield. Pectinases are enzymes of large industrial application, mainly used in juices and vegetal pulp processing. These enzymes are also used in processes in which the pectin elimination is necessary, such as wine production, coffee and teas processing and textile industry. This work presents the production of exopolygalacturonase and pectin lyase by the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* in solid state fermentation using different agro-industrial residues.

Some fermentative parameters, as fermentation recipient (Erlenmeyer flasks and polypropylene packing), pH (5.0, 5.5 and 6.0), initial moisture of the substrate (70% and 80%) and temperature of incubation (50°C and 55°C) had been evaluated, aiming the increase of the pectinases production. Six different types of nutrient solutions were also evaluated as supplement of the substrate. Moreover, the enzymes were physical-chemical characterized and the fungus enzymatic profile were evaluated.

In the initial assays, the fermentation occurred during a period of 14 days. The substrate chosen for the enzymes production was the sugarcane bagasse and orange bagasse, in the proportion of 30%/70% (w/w). The conditions that had provided the greater polygalacturonase production were: 4 days of fermentation, cultivation in Erlenmeyer flasks, initial pH 5.0, initial moisture of 70% and growth temperature of 50°C. On the other hand, for the pectin lyase, the best conditions had been: 10 days of fermentation, cultivation in polypropylene packing, initial pH 5.0, initial moisture of 70% and growth temperature of 50°C. The more appropriate nutrient solution for the enzymes production was composed of NH_4NO_3



0.1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%. The pectinases were thermostable, retaining more than 80% of their activity for 1 hour at 60°C and they were also stable in an extensive pH range.

The results obtained showed that *Thermoascus aurantiacus* has a great potential of other hydrolytic enzymes production, such as carboxymethylcellulase, xylanase and ligninases. The production of these enzymes, besides pectinases, shows that this microorganism has a great potential of enzymatic complexes production, which can be applied in different industrial processes.



III- INTRODUÇÃO

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécicas presentes no material vegetal e são produzidas principalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

As pectinases microbianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa (FSM) quanto em estado sólido (FES). Recentemente, o processo de fermentação em estado sólido tem se mostrado muito promissor na produção de enzimas (PANDEY *et al.*, 2000a). Dentre os processos fermentativos usados para a produção de enzimas, este apresenta uma série de vantagens em relação à fermentação submersa, como a maior concentração dos produtos formados, menor espaço requerido para equipamentos, facilidade de extração do produto desejado, e diminuição de problemas de contaminação microbiana (AIDOO *et al.*, 1982). Além disso, permite o uso de resíduos agro-industriais como substratos, os quais são convertidos em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, antibióticos, biocombustíveis, proteínas e enzimas (PANDEY *et al.*, 2000a).

Há vários fatores importantes que afetam o processo de FES, dentre eles, a linhagem microbiana e os substratos adequados. Além disso, a seleção de parâmetros físico-químicos e bioquímicos é fundamental para o bom rendimento da fermentação (HESSELTINE, 1972; PANDEY *et al.*, 2000a).

A síntese de enzimas pelos microrganismos é altamente influenciada pela composição do substrato utilizado no processo fermentativo, particularmente pela concentração de fontes de carbono e nitrogênio. Assim, a seleção do substrato a ser utilizado na fermentação representa um importante passo para uma boa produção (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, um simples enriquecimento do substrato com uma fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é



suficiente para a produção de quantidades significativas tanto de biomassa microbiana quanto de enzimas (BISARIA e GHOSE, 1981; ELISASHVILI, 1993).

Diferentes recipientes também podem diferir em algumas propriedades importantes, como concentração de oxigênio e transferência de calor, influenciando o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a produção enzimática. Dessa forma, a seleção de recipientes (fermentadores) torna-se importante nos estudos de otimização das condições de produção de enzimas (AIDOO *et al.*, 1982).

A produção de pectinases por microrganismos é também altamente influenciada pelas condições de cultivo, em particular pelo meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e umidade inicial do substrato e temperatura de cultivo do microrganismo (AGUILAR *et al.*, 1991).

Dessa forma, é fundamental o conhecimento dos parâmetros que afetam a síntese do produto que se deseja obter em um determinado processo fermentativo, considerando que tais condições podem variar entre os diferentes microrganismos, assim como para os diferentes produtos (BRAVO *et al.*, 2000).

As pesquisas de produção de enzimas por microrganismos termofílicos têm crescido significativamente nos últimos anos (HOLST *et al.*, 1997; VIEILLE e ZEIKUS, 2001). A atenção dos pesquisadores para estes microrganismos deve-se principalmente às características intrínsecas de suas enzimas, tais como a alta estabilidade à temperatura, ao pH e a agentes químicos (BRUINS *et al.*, 2001).

As enzimas dos termofílicos são geralmente mais termoestáveis quando comparadas com as dos mesofílicos e podem ser usadas em diversos processos industriais, podendo substituir enzimas mesofílicas ou agentes químicos. Sob o ponto de vista industrial, torna-se cada vez mais importante a seleção e o estudo das propriedades de enzimas produzidas por microrganismos termofílicos, uma vez que estas enzimas

atuam em vários processos que requerem altas temperaturas (BRUINS *et al*, 2001).

A caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheça suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (KASHYAP *et al*, 2001).

O conhecimento do perfil enzimático, ou seja, do conjunto de enzimas que um microrganismo produz em um determinado substrato, permite avaliar as potencialidades do preparado enzimático obtido. A presença de um conjunto específico de enzimas pode ser desejável em alguns processos, por exemplo, no processamento de alguns tipos de sucos, mas, por outro lado, alguns processos requerem a presença de apenas um grupo enzimático específico. Dessa forma, é importante conhecer quais enzimas são produzidas por determinado microrganismo, quando visa-se a aplicação industrial das mesmas (ALKORTA *et al*, 1998).



IV- OBJETIVOS GERAIS

- 1- Estudar a produção de pectinases termofílicas e termoestáveis pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais como substratos;
- 2- Avaliar o efeito do tipo de embalagem e da suplementação do substrato com diferentes fontes de nutrientes, sobre a produção das enzimas em FES;
- 3- Estudar os efeitos da variação do pH, temperatura e umidade, sobre a produção das enzimas;
- 4- Caracterizar as pectinases e traçar o perfil enzimático produzido pelo fungo.

V- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos coloidais, constituídos de uma cadeia principal de resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações α (1 $\rightarrow$ 4). As cadeias contêm regiões ricas em L-ramnose, contendo arabinose, galactose e xilose como cadeias laterais. Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. Alguns dos grupos hidroxilas nos carbonos C2 e C3 podem estar acetilados (FOGARTY e WARD, 1972).

Baseado nos tipos de modificações da cadeia principal, as substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido péctico, ácido pectínico e pectina (ROMBOOTS e PILNIK, 1980).

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

1.2- Ácido Péctico: são os ácidos poligalacturônicos que não apresentam metoxilação.

1.3- Ácido Pectínico: são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos. Estes compostos apresentam a propriedade de formar gel na presença de açúcar e cátions divalentes.

1.4- Pectina: é o nome genérico de misturas pécticas que contêm ácido pectínico como maior componente (Fig. 1).

As substâncias pécticas são os maiores componentes da lamela média e parede celular primária das células vegetais, podendo estar interligadas com outros polissacarídeos estruturais, como a celulose e hemicelulose. Além da função adesiva que exercem nas paredes celulares das plantas superiores, estas também estão envolvidas nas interações entre as plantas e seus patógenos e nas diferenças de

textura das frutas e vegetais durante o seu crescimento, amadurecimento e armazenamento (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

Tradicionalmente, as substâncias pécicas são usadas na indústria de alimentos como agentes geleificantes e como fibras nutricionais (ALKORTA *et al.*, 1998). Por outro lado, podem representar um problema nas várias etapas do processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores.

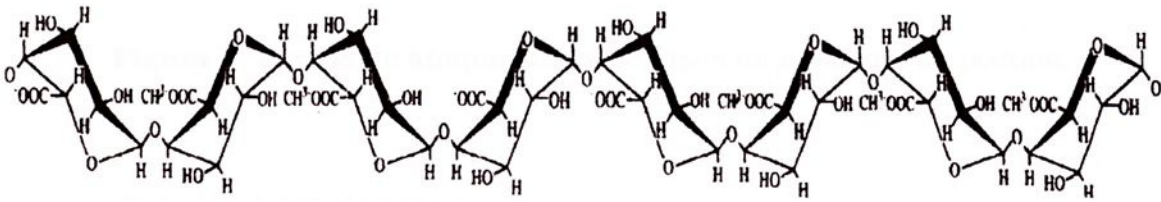


Figura 1: Estrutura da molécula de pectina.

2- Enzimas pécicas

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécicas presentes no material vegetal.

A classificação destas enzimas é baseada no modo de ataque à cadeia de ácido galacturônico dos polímeros pécicos, sendo descritos três tipos de enzimas: as desesterificantes (pectinesterases), as despolimerizantes (hidrolases e liases) e as protopectinases. A classificação ainda pode ser baseada na preferência pelo substrato (pectina ou pectato) e na região em que atuam na molécula, podendo, neste caso, atuar de forma randômica (atividade endo) ou a partir da extremidade não redutora da molécula (atividade exo) (FOGARTY e WARD, 1972). Os pontos de ataque das enzimas pécicas na molécula de pectina estão representados na figura 2.

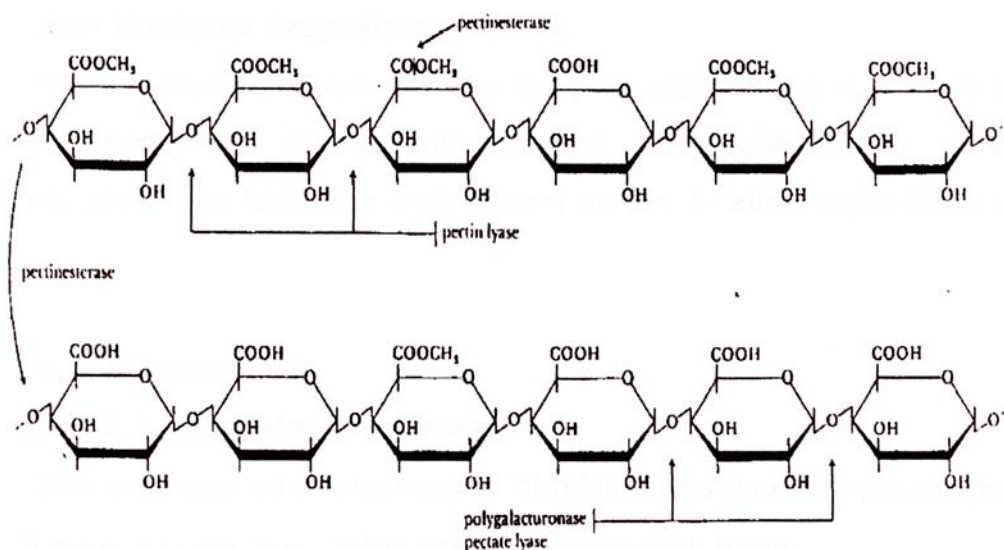


Figura 2: Pontos de ataque das pectinases na molécula de pectina.

2.1- Protopectinases

São enzimas que solubilizam as protopectinas, formando pectina solúvel altamente polimerizada (KASHYAP *et al.*, 2001). Estas ainda podem ser divididas em tipo A, que atuam na região do ácido poligalacturônico da protopectina e tipo B, que reagem com as cadeias de polissacarídeos que conectam as cadeias de ácido poligalacturônico aos constituintes da parede celular vegetal.

2.2- Enzimas Desesterificantes

2.2.1- Pectinesterases

São enzimas que atuam removendo grupos metoxílicos das substâncias pécticas, atuando também sobre a pectina com alto grau de metoxilação, formando ácido péctico. A pectina de baixa metoxilação liberada pode ainda ser hidrolisada pela poligalacturonase.

As pectinesterases são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e pelas plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais de enzimas pécticas.

2.3- Enzimas despolimerizantes

São enzimas que rompem as ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) entre os monômeros de ácido galacturônico das substâncias pécicas, podendo atuar por hidrólise (hidrolases) ou por β - eliminação (liases).

2.3.1- Hidrolases

2.3.1.1- Poligalacturonases

São enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) no ácido pécico. Estas podem ser de dois tipos:

A- **Endo-poligalacturonases**: atuam pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) internas do ácido galacturônico de forma aleatória, causando a despolimerização da molécula. São produzidas por uma grande variedade de organismos, como fungos, bactérias e leveduras, plantas superiores e nematóides parasitas de plantas.

B- **Exo-poligalacturonases**: são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora. Estas podem ainda ser subdivididas em dois tipos:

B.1- **Exo-poligalacturonase 1**: hidrolisa ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora liberando monômeros de ácido galacturônico.

B.2- **Exo-poligalacturonase 2**: atua de maneira similar à Exo-poligalacturonase 1, porém libera ácidos digalacturônicos livres.

2.3.1.2- Polimetilgalacturonases

Estas enzimas também atuam pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) internas entre os resíduos de ácido galacturônico podendo também ser de dois tipos:



A- **Endo-polimetilgalacturonases:** hidrolisam as ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) da molécula de pectina de forma aleatória, atuando preferencialmente na pectina altamente esterificada.

B- **Exo-polimetilgalacturonases:** provocam a clivagem das ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) da pectina, a partir da extremidade não redutora da molécula.

Embora existam alguns trabalhos descrevendo a atividade catalítica das polimetilgalacturonases, a existência destas enzimas parece ser questionável, uma vez que preparações de poligalacturonases, contaminadas com pectinesterases, podem ter sido descritas como sendo de polimetilgalacturonases (ALKORTA *et al.*, 1998).

2.3.2- Liases

As liases, também chamadas de trans-eliminases, quebram as ligações glicosídicas de qualquer pectato, por ação endo ou exo-poligalacturonato liase, ou da pectina (endo e exo-polimetilgalacturonato liase).

2.3.2.1- Polimetilgalacturonato liases (Pectina liases)

São enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio, a partir da ligação entre os carbonos 4 e 5 do ácido galacturônico. Estas são comumente chamadas de pectina liases e sua ação provoca um aumento da absorbância a 235 nm, devido à formação de uma dupla ligação entre os carbonos envolvidos na reação. Estas podem ser divididas em dois tipos:

A- **Endo-polimetilgalacturonato liases:** catalisam de forma aleatória a ruptura das ligações α (1 $\rightarrow$ 4) da pectina.

B- **Exo-polimetilgalacturonato liases:** catalisam a ruptura das ligações α (1 $\rightarrow$ 4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora.



2.3.2.2- Poligalacturonato liases (Pectato liases)

São enzimas que apresentam uma ação semelhante a das polimetilgalacturonato liases, porém atuam sobre o poligalacturonato desmetoxilado (ácido pectico). Estas também podem ser divididas em dois tipos:

A- **Exo-poligalacturonato liases**: catalisam a clivagem das ligações α (1 $\rightarrow$ 4) do ácido pectico de forma randômica.

B- **Endo-poligalacturonato liases**: catalisam a clivagem das ligações α (1 $\rightarrow$ 4) do ácido pectico a partir da extremidade não redutora da molécula.

3- Fermentação em estado sólido e utilização de resíduos agro-industriais na produção de enzimas microbianas

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como o processo fermentativo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre, empregando um substrato sólido natural como fonte de carbono e energia ou ainda esse substrato pode servir apenas como suporte inerte, devendo ser enriquecido com outras fontes de carbono e nutrientes. O mesmo, no entanto, deve conter umidade suficiente para sustentar o crescimento microbiano, sendo que as moléculas de água estão na forma adsorvida ou complexadas com a matriz sólida (PANDEY, 1992; PANDEY, 2000a).

3.1- Histórico

Desde o início da sua história o homem utiliza microrganismos para o seu benefício. O processo de fermentação em estado sólido, associado a diferentes organismos, sempre representou um importante instrumento para a obtenção de produtos de interesse econômico. O uso de microrganismos na preparação de alimentos (pão, queijo e vários outros) e como próprio alimento (como os fungos comestíveis desenvolvidos em madeira e solo) datam de centenas de anos e são alguns exemplos da utilização do processo de FES (AIDOO *et al.*, 1982).

Há aproximadamente 2600 anos A.C. o processo fermentativo já era usado pelos egípcios na produção de pão (OOIJKAAS *et al.*, 2000) e o desenvolvimento do processo “Koji” data de 1000 anos A.C. (AIDOO *et al.*, 1982). Este último consiste em uma preparação enzimática obtida pelo crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus soyae* em arroz cozido e outros cereais, utilizada na produção de várias comidas orientais (CANNEL e MOO-YOUNG, 1980). Este processo é de grande importância histórica para a tecnologia da FES e pode ser considerado como um protótipo da mesma.

Recentemente, a FES tem mostrado ser um processo muito promissor no desenvolvimento de vários bioprocessos, como na biorremediação e biodegradação de compostos tóxicos, desintoxificação de resíduos agro-industriais, biotransformação de resíduos de colheitas para enriquecimento nutricional e na obtenção de produtos de alto valor agregado, como metabólitos secundários (antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento vegetal, etc), ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis, compostos aromáticos e enzimas (PANDEY *et al.*, 2000a).

3.2- Características gerais da fermentação em estado sólido

Há vários fatores importantes que afetam o processo de FES, dentre eles, a linhagem microbiana e os substratos adequados. Além disso, a seleção de parâmetros físico-químicos e bioquímicos é fundamental para o bom rendimento da fermentação (HESSELTINE, 1972; PANDEY *et al.*, 2000a).

Na produção de enzimas, linhagens bacterianas têm sido selecionadas e utilizadas com sucesso, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dentre os fungos filamentosos, os Phycomicetos (*Mucor* e *Rhizopus*), Deuteromicetos (*Aspergillus* e *Penicillium*) e Basidiomicetos são ainda os mais utilizados (PANDEY *et al.*, 2000a).



A seleção do substrato para os processos de FES depende de vários fatores, principalmente aqueles relacionados ao seu custo e eficiência. Neste contexto, a utilização de resíduos agro-industriais torna-se um atrativo para os processos de FES.

A aplicação destes resíduos em bioprocessos tornou-se importante sob o ponto de vista ambiental, reduzindo problemas relacionados ao seu manejo inadequado e conseqüentes danos ambientais. Além disso, o baixo custo e a grande disponibilidade desses materiais fazem dos mesmos excelentes substratos alternativos para vários processos industriais (PANDEY *et al.*, 2000b).

3.3- Vantagens da FES

A fermentação em estado sólido apresenta uma série de vantagens em relação à submersa (FSM). Dentre estas vantagens, destacam-se (AIDOO *et al.*, 1982; CANNEL e MOO-YOUNG, 1980; HESSELTINE, 1972):

- 1- É um processo mais simples e de menor custo.
- 2- Há uma maior concentração dos produtos formados.
- 3- O produto desejado pode ser facilmente extraído pela adição de solventes apropriados.
- 4- O espaço necessário para equipamentos é relativamente menor, pois uma pequena quantidade de água é usada, o substrato é concentrado e o requerimento energético é menor.
- 5- A aeração é facilmente obtida, desde que haja espaços entre as partículas de substrato.
- 6- No caso da utilização de fungos, as condições nas quais estes crescem são mais similares às de seu habitat natural.
- 7- Por estar próximo ou na ausência de água livre, a FES reduz significativamente os riscos de contaminação bacteriana. Esta propriedade torna-se ainda mais notável quando se utilizam microrganismos termofílicos, devido à redução da contaminação por mesofílicos.

8- Apresenta um especial interesse nos países em que há abundância de biomassa e de resíduos agro-industriais, que podem ser utilizados como substratos para o desenvolvimento de vários produtos.

No caso de produção de enzimas, outros fatores ilustram as vantagens deste processo, tais como: a menor repressão catabólica na produção enzimática e a maior termoestabilidade e tolerância ao pH das enzimas obtidas.

Solís-Pereira *et al.* (1993) compararam a produção de pectinases por *Aspergillus niger* CH4 em FSM e FES, avaliando o efeito da adição de glicose, sacarose e ácido galacturônico nos dois sistemas fermentativos. As atividades das enzimas endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase (0,5 U/mL e 8,0 U/mL, respectivamente) foram inferiores às obtidas em FES (6,0 U/g e 17,0 U/g, respectivamente) e altas concentrações de glicose estimularam a produção das enzimas em FES, enquanto que, em FSM, levaram à repressão catabólica.

Acuña-Argüelles *et al.* (1995) compararam a produção e as propriedades das pectinases produzidas por *Aspergillus niger* nos dois processos fermentativos, investigando o tempo de produção e a estabilidade das enzimas à temperatura e pH. A máxima atividade de endo-poligalacturonase nos dois processos fermentativos ocorreu após 96 horas de cultivo, sendo cerca de 200 U/g em FES e 150 U/g em FSM. A produção de pectina liase em FES teve o seu pico em 48 horas (70 U/g), enquanto que em FSM (50 U/g) ocorreu após 96 horas de cultivo. Segundo os autores, as pectinases produzidas por FES apresentaram maiores termoestabilidade e estabilidade a valores extremos de pH. Em pH 9,0, a pectina liase produzida por FES manteve 50% de sua atividade original, enquanto que aquela obtida em FSM praticamente não apresentou atividade.

4- Aplicação das pectinases na indústria de alimentos

A aplicação comercial das pectinases foi primeiramente observada em 1930 na produção de vinhos e sucos de frutas. A partir dos anos 60, com a maior elucidação da natureza química dos tecidos vegetais, a utilização destas enzimas vem sendo feita com maior eficiência em vários outros processos (KASHYAP *et al.*, 2001).

O tecido das frutas é formado por células parenquimatosas cuja parede celular e lamela média são ricas em pectina, celulose e hemiceluloses. As substâncias pécticas representam cerca de 0,5 a 4% do peso total das frutas e são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos obtidos.

Quando a fruta é moída, a célula se rompe liberando a fase aquosa. Uma fração da pectina, chamada solúvel, distribui-se nessa fase aquosa (suco) e a outra, chamada insolúvel, permanece ligada à parede celular, compondo a polpa. Esta última fração dificulta a extração do suco por prensagem ou por outros métodos mecânicos. Com adição de pectinases à polpa, a estrutura do gel entra em colapso em função da degradação das moléculas de pectina e o suco é mais facilmente obtido, aumentando o seu rendimento (DA SILVA *et al.*, 1997).

A turbidez dos sucos de frutas deve-se à presença de vários componentes em suspensão, como proteínas e polifenóis em um estado coloidal com as pectinas. Em muitos tipos, principalmente os cristalinos, a clarificação é necessária para manter a uniformidade do produto, tornando-o mais atraente ao consumidor (SREENATH e SANTHANAM, 1992). A clarificação, um processo requerido para facilitar a filtração e remover a turbidez do suco, representa a mais antiga aplicação das enzimas pécticas (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

Além disso, a presença das substâncias pécticas causa problemas de geleificação durante a concentração dos sucos, dificultando a retirada da água e podendo causar o entupimento de filtros e a diminuição da velocidade do processamento.

A adição de pectinases resulta em uma rápida redução da viscosidade, bem como na floculação destas micelas presentes (ALKORTA *et al.*, 1998), permitindo que estas partículas possam ser separadas por sedimentação ou filtração. Estas enzimas também são utilizadas para a estabilização da cor e do "flavour" dos sucos (SOLEHAH *et al.*, 1994).

As enzimas que degradam a parede celular das células vegetais, incluindo as pectinases, podem ser usadas também na extração de óleo vegetal. Recentemente, preparados comerciais destas enzimas têm sido usados na produção do óleo de oliva. Por romperem a parede celular, elas facilitam a liberação do óleo nas técnicas de separação, aumentando o rendimento (KASHYAP *et al.*, 2001).

Na produção de vinhos, as pectinases atuam tanto na clarificação do vinho branco, por degradação da pectina em suspensão, quanto na retenção de cor do vinho tinto, uma vez que facilitam a liberação do pigmento da casca durante a fermentação. Além disso, facilitam a prensagem para a sua extração. As pectinases produzidas por fungos, principalmente de *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* e *Botrytis cinerea*, são utilizadas para este propósito (KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectinases desempenham também um importante papel na fermentação de chá e café. A fermentação do café utilizando microrganismos pectinolíticos é usada para remover a camada de mucilagem e parte das substâncias pécticas do grão. Estas enzimas, principalmente as de origem fúngica, também são utilizadas na produção de chás. O tratamento enzimático acelera a sua fermentação e melhora as propriedades dos chás em pó instantâneos, devido à degradação da pectina. O grau de hidrólise da pectina tem fundamental importância econômica nas indústrias de processamento de chá e café, devido ao seu papel significativo no rendimento da produção e na qualidade do produto final (BOCCAS *et al.*, 1994).

Na indústria têxtil, a adição de pectinases facilita a separação das fibras de celulose através da degradação das moléculas de pectina

interligadas à mesma e à hemicelulose. Estas enzimas também vêm sendo aplicadas na degomagem de fibras derivadas da juta, rami e outros vegetais utilizados na fabricação de roupas, fios, lonas, etc. Estas fibras contêm aproximadamente 20 a 35% de material gomoso incrustado, constituído principalmente de pectina e celulose, o qual precisa ser removido para a utilização industrial das mesmas. Tradicionalmente, a remoção é feita por processos de degomagem química com soluções alcalinas aquecidas, que geram resíduos prejudiciais ao ambiente e apresentam um alto consumo de energia. Uma das soluções para estes problemas vem sendo a utilização de processos biotecnológicos que envolvem a utilização de pectinases ou combinações de pectinases e xilanases, que, além de ser uma alternativa econômica, não provoca danos ao ambiente (KAPOOR *et al.*, 2001).

As enzimas pécticas representam cerca de 1/4 da produção de enzimas utilizadas em alimentos. O valor de mercado estimado de todas as enzimas industriais em 1995 era de US\$1 bilhão, sendo que US\$75 milhões era representado pelas pectinases. O estimado para o mercado em 2005 é de US\$1,7-2,0 bilhões, com tendência ao aumento da participação das pectinases nesse montante (KASHYAP *et al.*, 2001).

5- Produção de pectinases microbianas

As pectinases são produzidas principalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo que as microbianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa quanto em estado sólido (ROMBOUTS e PILNIK *et al.*, 1980).

A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos de origem microbiana varia com a espécie do microrganismo produtor e, dessa forma, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para a utilização industrial das mesmas.

Nos últimos anos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos despertaram grande interesse de estudo na produção de enzimas em virtude das inúmeras vantagens apresentadas por estes organismos, tais como (BRAVO *et al.*, 2000):

1- Não necessitam de amplos espaços para o seu crescimento.

2- Os fatores para seu crescimento, como concentração de nutrientes, pH, temperatura e concentração de Oxigênio podem ser manipulados.

3- Conseguem degradar variados substratos, inclusive resíduos agro-industriais.

4- Apresentam um crescimento rápido quando em condições favoráveis.

5- Podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de linhagens mais produtoras.

As preparações de pectinases mais comumente utilizadas são de origem fúngica, principalmente de *Aspergillus* e *Penicillium*. No entanto, o estudo de outros microrganismos produtores faz-se necessário, quando busca-se enzimas com características distintas, adequadas a materiais e processos industriais específicos (SATHISH KUMAR e PALANIVELU, 1998).

A produção por microrganismos é afetada por diversos fatores, como: tipo de processo fermentativo, tempo de incubação, tipo de substrato, umidade, concentração de oxigênio, pH e temperatura, dentre outros.

Os fatores que interferem na produção de pectinases microbianas têm sido estudados por diversos autores. Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) estudaram as condições ótimas de crescimento de *Aspergillus* ATHUM 3482, visando a produção de poligalacturonase através de FSM. Os autores investigaram a influência do tempo de cultivo, da fonte de nitrogênio e da temperatura sobre a produção da enzima. A maior produção ocorreu após 3 dias de cultivo e o fosfato de amônia foi a fonte de nitrogênio que propiciou a maior atividade enzimática (1,1

U/mL). A melhor temperatura de cultivo do fungo para a produção da enzima foi 25°C, na qual a atividade foi elevada a 3,2 U/mL.

Alaña *et al.* (1989) estudaram a produção de pectina liase (PL) por dezesseis linhagens fúngicas através de FSM, investigando o efeito de diferentes fontes de carbono, além da presença de pectina no meio de cultivo. Os resultados obtidos mostraram que *Penicillium italicum* foi o melhor produtor de PL dentre as linhagens testadas; a presença de pectina induziu a produção da enzima e esta foi maior quando adicionou-se 1% de pectina em relação à adição de 0,5% e ao meio sem pectina.

Estudos de produção de pectinases em FSM utilizando indutores diferentes da pectina comercial, visando reduzir o custo da produção, também vêm sendo feitos. Fonseca e Said (1994) compararam a produção de endo-poligalacturonase em FSM utilizando polpa de laranja e pectina como indutores da enzima e observaram que a primeira foi mais eficiente (0,445 U/mL) em comparação com a pectina (0,184 U/mL). Resultados similares foram obtidos por Larios *et al.* (1989) com *Aspergillus* CH4-1043, que apresentou alta produção de endo-poligalacturonase (endo-PG) e exo-poligalacturonase (exo-PG) em meio líquido contendo casca de limão como indutor. A produção de endo-PG em meio contendo casca de limão foi 26,17 U/mL, e 6,08 U/mL quando cultivado em meio contendo pectina. A adição da casca de limão também proporcionou uma maior produção de exo-PG (24,0 U/mL) quando comparada com a obtida em meio com pectina (23,7 U/mL).

Minussi *et al.* (1998) relataram a produção de poligalacturonase e pectina liase por *Penicillium griseoroseum* na presença de caldo de cana-de-açúcar. Foi observado que o caldo de cana, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de induzir a produção das enzimas.

Estudos comparativos de produção de pectinases em FSM e FES mostram que o processo de FES é geralmente mais eficiente. Solís-Pereira *et al.* (1993) compararam a produção de pectinases por

Aspergillus niger em FSM e FES utilizando diferentes fontes de carbono. Os resultados mostraram que a produção das enzimas foi bem maior em FES e também indicaram que fenômenos regulatórios, como indução-repressão, são diferentes nos dois tipos de fermentação.

O uso de FES para a produção de pectinases tem sido proposto com a utilização de diversos resíduos agro-industriais como substratos.

Soares *et al.* (2001) obtiveram boa produção de pectinases por cinco linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus*, através de FES de farelo de trigo. A atividade máxima de exo-PG foi 40,0 U/g, após 120 horas de fermentação e a de PL foi 1.000,0 U/g, neste mesmo período. Este substrato também foi utilizado com sucesso na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* (CASTILHO *et al.*, 1999).

Hours *et al.* (1988) relataram a produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus foetidus* através de FES, utilizando polpa de maçã como substrato. A maior atividade obtida foi 1062 U/g, após 48 horas de cultivo. Este material também proporcionou uma boa produção de PG por *Penicillium expansum*, segundo Yao *et al.* (1996).

Zheng e Shetty (2000) estudaram a produção de poligalacturonase por *Lentinus edodes*, através de FES em polpa de maçã e de morango. Os resultados mostraram que a polpa de morango foi um bom substrato para a produção da enzima, proporcionando atividade máxima de 29,4 U/g.

Maldonado *et al.* (1986) estudaram a produção de pectinesterase e endo-poligalacturonase por *Aspergillus* sp. através de FES, tendo casca de limão como fonte de carbono. Este substrato também foi utilizado com sucesso na produção de poligalacturonase por *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, conforme relatado por Larios *et al.* (1989).

Couri *et al.* (2000) relataram a produção das enzimas poligalacturonase, xilanase e protease por *Aspergillus niger* 3T5B8 através da fermentação de casca de banana, de manga e farelo de trigo. Os resultados mostraram que a casca de manga e o farelo de trigo foram os melhores substratos para a produção das enzimas.

Os estudos com a utilização de bagaço de laranja têm mostrado que este material pode proporcionar uma alta produção de enzimas pectinolíticas por diversas linhagens microbianas. Garzón e Hours (1992) relataram a produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus foetidus* em FES, utilizando esse material. A máxima atividade obtida foi 1687 U/g, após 60 horas de cultivo. Ismail (1996) também obteve um complexo enzimático contendo pectinase, celulase e xilanase utilizando bagaço de laranja como substrato para o crescimento de seis linhagens fúngicas.

O bagaço de cana-de-açúcar também tem sido usado na produção de pectinases (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1994). Entretanto, esse material é geralmente usado como substrato inerte, requerendo suplementação de fonte de carbono e nitrogênio para sustentar o crescimento microbiano. Sua importância está na diminuição do grau de compactação do meio, permitindo uma melhor aeração e troca de calor (OOIJKAAS *et al.*, 2000).

Vários outros resíduos agro-industriais também têm sido utilizados como substratos na produção de enzimas pectinolíticas, tais como farelo de soja (CASTILHO *et al.*, 2000), polpa e casca de café (ANTIER *et al.*, 1993; BOCCAS *et al.*, 1994) e polpa de cacau (SCHWAN *et al.*, 1997).

6- Produção de pectinases por microrganismos termofílicos

Dentre os organismos eucariotos, somente poucas espécies de fungos apresentam a habilidade de crescer a temperaturas entre 45 e 55°C. A termofilia em fungos não é tão extrema como em eubactérias ou archaeobactérias, as quais podem crescer em temperaturas de cerca de 100°C, em fontes termais ou outros ambientes exóticos. Talvez por seu moderado grau de termofilia e pelo fato de não ocuparem ambientes extremos, os fungos termofílicos não vinham recebendo merecida atenção (MAHESHWARI *et al.*, 2000).

No entanto, microrganismos termofílicos têm sido de grande interesse científico, principalmente em relação ao seu potencial biotecnológico, como a produção de enzimas termoestáveis (HOLST *et al.*, 1997).

As enzimas produzidas por organismos termofílicos têm sido estudadas com vistas à sua aplicação em bioprocessos, além de servirem como modelos para estudos bioquímicos. Muitas pesquisas têm focado a identificação de linhagens fúngicas termofílicas capazes de produzir enzimas específicas ou o estudo de suas propriedades (BRUINS *et al.*, 2001).

A habilidade das enzimas termofílicas em atuar a altas temperaturas permite que os bioprocessos ocorram em temperaturas mais altas e, com isso, várias vantagens podem ser inferidas (AQUINO, 2000; BRUINS *et al.*, 2001; LEA, 1998):

- Apresentam uma alta estabilidade à temperatura e são geralmente mais resistentes a agentes detergentes e a enzimas proteolíticas.
- Como o processo ocorre a altas temperaturas, o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos é reduzido.
- Em processos com substratos fluidos, em altas temperaturas a viscosidade do substrato é reduzida, facilitando o seu bombeamento, filtração e centrifugação e permitindo o uso de menor quantidade de água, o que conseqüentemente baixa os custos de produção.
- Mais substrato pode ser dissolvido em altas temperaturas, proporcionando um maior rendimento e menor tempo necessário para os processos.
- Devido ao fato destas enzimas geralmente serem estáveis em amplas faixas de pH, estas podem ser usadas no processamento de vários tipos de sucos e vegetais.

Os fungos termofílicos são os principais componentes da microbiota que se desenvolve em processos de compostagem de material vegetal e em outros acúmulos de matéria orgânica nos quais o

aquecimento, a umidade e as condições aeróbias provêm as condições básicas para o seu desenvolvimento (MAHESHWARI *et al.*, 2000).

Pelo fato da pectina ser um importante constituinte da parede celular vegetal, seria esperado que as enzimas pecticas fossem comumente produzidas por fungos termofílicos envolvidos na decomposição de material vegetal em altas temperaturas. No entanto, poucas espécies de fungos termofílicos produtores destas enzimas têm sido isolados e identificados (MAHESHWARI *et al.*, 2000) e, da mesma forma, poucas informações são encontradas a respeito de características bioquímicas e estruturais de pectinases termofílicas e termoestáveis.

Sathish Kumar e Palanivelu (1998) investigaram a produção e as propriedades da poligalacturonase produzida por *Thermomyces lanuginosus* em meio contendo pectina como fonte de carbono. A enzima apresentou maior atividade em pH 5,5 e a 70°C quando pectato de potássio foi adicionado ao meio e em pH 4,5 e a 50°C quando foi utilizada apenas pectina como substrato.

Sathish Kumar e Palanivelu (1999) relataram a caracterização e purificação da enzima poligalacturonase por este mesmo fungo. A enzima purificada apresentou a máxima atividade em pH 5,5, uma temperatura ótima de 60°C e reteve aproximadamente 50% de sua atividade a 50°C, após 6 horas.

Martins *et al.* (2002) investigaram a produção e caracterização das enzimas poligalacturonase e pectina liase pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, através da fermentação em estado sólido utilizando diferentes resíduos agro-industriais. O substrato composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja proporcionou uma boa produção de ambas as enzimas, que apresentaram-se bastante termoestáveis. A atividade máxima da PG produzida ocorreu em pH 4,5 e a 65°C e a de PL ocorreu em pH 10-10,5, nesta mesma temperatura. As enzimas PG e PL mantiveram-se estáveis a 60°C durante 1 e 5 horas, respectivamente.

Alguns trabalhos de produção de pectinases com linhagens bacterianas termofílicas também têm sido relatados.

Singh *et al.* (1999a) relataram a produção e caracterização de uma pectato liase por *Bacillus licheniformis*. A enzima apresentou pH ótimo 11,0 e temperatura ótima de 69°C. Na temperatura de 65°C, esta manteve 100% da sua atividade original, durante 2 horas.

Takao *et al.* (2000) estudaram a produção de uma pectato liase termoestável por *Bacillus* sp. TS47 em meio contendo poligalacturonato e de uma protopectinase, em meio contendo protopectina de limão. A enzima pectato liase purificada apresentou atividade máxima em pH 8,5 e a 70°C e manteve 50% da sua atividade original a 65°C durante 13 horas e a 70°C, durante 1 hora.

6.1- Adaptações moleculares da termofilia

A temperatura é um dos principais fatores que influencia o crescimento e a sobrevivência dos organismos. Em temperaturas elevadas, as reações químicas e enzimáticas na célula ocorrem mais rapidamente e o crescimento microbiano é conseqüentemente mais rápido e acentuado. No entanto, sob temperaturas mais altas que a temperatura ótima para o microrganismo, as proteínas, os ácidos nucleicos e outros componentes celulares podem ser irreversivelmente danificados. Além disso, quando a temperatura é aumentada até uma determinada faixa, o crescimento e as funções metabólicas aumentam até o ponto em que ocorre a inativação dos componentes citados (BROCK *et al.*, 1998).

Diante disso, os microrganismos apresentam uma temperatura mínima de crescimento, abaixo da qual não ocorre o seu crescimento, uma temperatura ótima, na qual o crescimento microbiano é máximo e uma temperatura máxima, acima da qual o crescimento não é possível e ocorre a morte celular, por colapso da membrana citoplasmática e desnaturação de proteínas e DNA. Estas temperaturas são geralmente



características para cada microrganismo, mas não são completamente fixadas, uma vez que podem ser modificadas por fatores ambientais, principalmente pela composição do meio de crescimento (BROCK *et al.*, 1998).

Os organismos que se desenvolvem em temperaturas de cerca de 45°C são chamados de termofílicos, enquanto que aqueles que crescem em temperaturas superiores a 80°C são chamados de hipertermofílicos. Estas temperaturas elevadas são encontradas na natureza somente em algumas áreas restritas, como em solos completamente expostos à luz solar, nos quais a temperatura pode chegar a 50°C e em pilhas de material vegetal em decomposição, onde a temperatura geralmente atinge 60-65°C. No entanto, os ambientes que apresentam as maiores temperaturas são aqueles relacionados à fenômenos vulcânicos, nos quais apenas os hipertermofílicos conseguem se desenvolver (VIEILLE e ZEIKUS, 2001). A condição de hipertermofílico não se aplica aos fungos, visto que os mesmos, por serem organismos eucarióticos, são menos resistentes às elevadas temperaturas, em função do sistema de membranas, que compõe suas organelas, serem susceptíveis ao desarranjo provocado pelo calor (BROCK *et al.*, 1998).

Os organismos termofílicos apresentam algumas adaptações que permitem o seu crescimento sob altas temperaturas. Primeiro, suas enzimas e outras proteínas são muito mais estáveis ao calor que aquelas presentes nos organismos mesofílicos e atuam otimamente sob altas temperaturas (PELCZAR *et al.*, 1996).

As termoenzimas, como são chamadas as enzimas termoestáveis, são produzidas por microrganismos termofílicos e hipertermofílicos, os quais apresentam temperatura ótima entre 60°C e 125°C (VIEILLE e ZEIKUS, 1996).

A estabilidade das proteínas é resultado de um balanço entre forças estabilizadoras e desestabilizadoras das moléculas e, conseqüentemente, pequenas mudanças nestas forças podem resultar em uma grande mudança em sua estrutura funcional. A estabilidade

conformacional é resultado de um compromisso entre dois fatores opostos: a flexibilidade, para a função catalítica da enzima; e a rigidez, para a sua estabilidade conformacional. As termoenzimas são significativamente mais rígidas que enzimas mesofílicas à temperatura ambiente, sendo que esta alta rigidez protege as proteínas da desnaturação e mantém a sua estrutura cataliticamente ativa. Este aumento na rigidez é essencial para preservar a sua estrutura catalítica ativa e para protegê-la da desnaturação. Esta rigidez é demonstrada pela menor taxa de troca de hidrogênio e pela menor susceptibilidade à degradação por proteólise, por agente químicos e pela temperatura (BRUINS *et al.*, 2001).

Alguns estudos com enzimas termofílicas têm mostrado que estas geralmente diferem muito pouco na sequência de aminoácidos, quando comparada com as enzimas que catalisam as mesmas reações nos mesofílicos. Aparentemente, a substituição de alguns aminoácidos em um ou poucos locais das enzimas permite a estas apresentar uma maior termoestabilidade. Estudos com vários grupos de enzimas indicam que alguns aminoácidos, como alanina, arginina, prolina e leucina, contribuem para melhorar a eficiência de empacotamento das enzimas (através de mais interações hidrofóbicas) e para aumentar a sua rigidez (através da estabilização de α -hélices e otimização de interações). No entanto, excluindo as variações filogenéticas, as termoenzimas são geralmente similares às enzimas mesofílicas que catalisam as mesmas reações: a sequência de aminoácidos é de 40 a 85% similar, suas estruturas tridimensionais são superpostas e apresentam os mesmos mecanismos de catálise (VIEILLE e ZEIKUS, 1996).

A estabilidade à temperatura é também conseguida através do aumento do número de ligações com sais (ligação das cargas nos aminoácidos com Na^+ ou outros cátions) e pelo empacotamento altamente hidrofóbico da proteína. Além disso, fatores extrínsecos, como poliaminas ou glicosilação, ajudam a estabilizar certas

termoenzimas. Além das enzimas e outras proteínas celulares, a maquinaria de síntese protéica (ribossomos, RNAs e outros componentes), bem como a membrana citoplasmática, são também mais resistentes à temperatura (TOLNER *et al.*, 1997).

A membrana citoplasmática dos termofílicos é rica em ácidos graxos saturados, que formam muito mais ligações hidrofóbicas que os ácidos graxos insaturados, e permitem às membranas permanecerem mais estáveis e funcionarem sob temperaturas elevadas (TOLNER *et al.*, 1997).

Os organismos eucariotos não se desenvolvem em ambientes com temperaturas superiores a 60°C. As membranas dos eucariotos parecem ser mais sensíveis à temperatura do que a membrana dos procariotos. Isto provavelmente é devido à estabilidade das membranas das organelas celulares, as quais devem ser suficientemente porosas para permitir a passagem de moléculas grandes, como o ATP e RNA (BROCK *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no interesse de produção das termoenzimas, devido ao grande potencial biotecnológico que apresentam. Elas têm sido usadas em biologia molecular (como a Taq polimerase), adicionadas em detergentes (proteases) e nas indústrias de processamento do amido (α -amilases, glicose-isomerases) e são potencialmente capazes de atuar em outros processos que requerem altas temperaturas (VIEILLE e ZEIKUS, 1996).



VI- CAPÍTULO I: SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

1- INTRODUÇÃO

Recentemente, o processo de fermentação em estado sólido tem se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários bioprocessos e produtos (PANDEY *et al.*, 2000a). Este processo tem apresentado uma série de vantagens em relação à fermentação submersa, tais como: há uma maior concentração dos produtos formados e o espaço requerido para equipamentos é menor, uma vez que menor quantidade de água é utilizada; o produto desejado pode ser facilmente extraído, pela adição de um solvente apropriado; a baixa umidade requerida para o crescimento fúngico minimiza problemas de contaminação microbiana (AIDOO *et al.*, 1982). Além disso, permite o uso de resíduos agro-industriais como substratos, os quais são convertidos em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, antibióticos, biocombustíveis, proteínas e enzimas (PANDEY *et al.*, 2000a).

O uso de fermentação em estado sólido para a produção de pectinases tem sido proposto com a utilização de diferentes resíduos agro-industriais, tais como farelo de trigo (CASTILHO *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 1999b; SOARES, 1999), farelo de soja (CASTILHO *et al.*, 2000), polpa de maçã (HANG e WOODAMS, 1994; HOURS *et al.*, 1998), bagaço de limão e laranja (FONSECA e SAID, 1994; GARZÓN e HOURS, 1992; LARIOS *et al.*, 1989; MALDONADO *et al.*, 1986) e bagaço de cana-de-açúcar (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1994), dentre outros.

As enzimas pécticas são utilizadas industrialmente na extração e clarificação de sucos, na maceração de tecidos vegetais para a produção de pastas e purês (ROMBOUTS e PILNIK, 1978). Estas também são



usadas em processos nos quais é necessária a eliminação da pectina, como na produção de vinho e no processamento de café e chás (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1995; BOCCAS *et al.*, 1994).

A síntese destas enzimas é altamente influenciada pela composição do substrato utilizado no processo fermentativo, particularmente pela concentração de fontes de carbono e nitrogênio (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Assim, a seleção do substrato a ser utilizado na fermentação representa um importante passo para uma boa produção.

A maioria das pesquisas enfocando a fermentação em estado sólido vêm sendo realizadas com a utilização de microrganismos mesofílicos. No entanto, a identificação de linhagens fúngicas termofílicas capazes de produzir enzimas termofílicas e termoestáveis específicas tem oferecido alternativas para processos biotecnológicos que utilizam enzimas com tais características (AQUINO, 2000).

Estas apresentam uma série de vantagens para a aplicação industrial, tais como: apresentam uma alta estabilidade à temperatura e são geralmente mais resistentes a agentes detergentes e a enzimas proteolíticas; como o processo ocorre a altas temperaturas, o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos é reduzido; em processos com substratos fluidos, em altas temperaturas a viscosidade do substrato é reduzida, facilitando o seu bombeamento, filtração e centrifugação e permitindo o uso de menor quantidade de água, o que conseqüentemente baixa os custos de produção; mais substrato pode ser dissolvido em altas temperaturas, proporcionando um maior rendimento e menor tempo necessário para os processos (BRUINS *et al.*, 2001).

Além disso, o processo fermentativo em estado sólido, sob altas temperaturas, é matéria de poucos estudos. Este processo pode apresentar alguns problemas, principalmente relacionados ao controle da umidade, pela rápida evaporação de água em altas temperaturas. Além disso, devido às atividades metabólicas do microrganismo e dependendo da altura da camada do substrato, uma grande quantidade

de calor é produzida durante a fermentação em estado sólido. Como a temperatura afeta diretamente o crescimento microbiano e a formação do produto, o calor produzido deve ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação (DELBIANCHI, 1990). Este fato pode ser mais grave quando a fermentação ocorre sob altas temperaturas, uma vez que a temperatura pode chegar a níveis muito elevados.

Estes problemas podem ser solucionados com o desenvolvimento e utilização de biorreatores específicos para microrganismos termofílicos. Kalogeris *et al.* (1999) desenvolveram um biorreator adequado para este fim. Estes conseguiram manter praticamente constantes os níveis de umidade e temperatura no biorreator e, além disso, obtiveram uma alta produção de endo-glucanase, β -glicosidade e xilanase pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*.



2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o substrato mais apropriado para a produção de poligalacturonase e pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, em fermentação em estado sólido;
- Avaliar a influência da adição de bagaço de cana-de-açúcar, utilizado como suporte inerte, na produção das enzimas;
- Definir o melhor tempo de cultivo do fungo para a produção de cada enzima.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Microrganismo

O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* 179-5 foi isolado a partir de amostra de serrapilheira e selecionado em trabalhos anteriores como bom produtor de xilanase, celulase e pectinase. O fungo foi identificado no Laboratório de Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

3.2- Meios de cultivo

3.2.1- Meio de manutenção

O fungo foi mantido em meio Sabouraud, a 7°C em geladeira, sob óleo mineral e em tubos criogênicos a -20°C, em meio contendo glicerol a 20%.

3.2.2- Meio para a fermentação e obtenção das enzimas

Foram utilizados como substratos para a fermentação o bagaço de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina de Açúcar e Alcool São Domingos de Catanduva-SP, o bagaço de laranja industrializado fornecido pela Citrovita S/A de Catanduva-SP e farelo de trigo, adquirido no comércio local. O bagaço de cana foi lavado com água corrente, seco a 80°C até peso constante, moído e peneirado usando peneira para seleção de partículas de 0,5 mm. Este foi misturado ao bagaço de laranja ou ao farelo de trigo, também secos em estufa a 60°C e moídos, nas proporções de 10%/90%, 30%/70% e 40%/60% (p/p). Os materiais, após misturados e homogeneizados, foram esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos.

3.3- Fermentação em estado sólido

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato esterilizado (120 °C/40 min). O material foi



inoculado com 10 mL de suspensão micelial, obtida através da suspensão da cultura de 4 dias em meio Sabouraud, em água estéril.

Após a inoculação, 10 ml de solução nutriente, composta por 0,1% de NH_4NO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, foram adicionados em cada frasco. O cultivo foi feito a 50°C, durante 14 dias.

A cada intervalo de 48 horas, um frasco correspondente a cada substrato foi retirado e em cada um foram adicionados 40 mL de água destilada, sendo posteriormente agitados por 40 minutos em "shaker" a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 1000 g durante 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

3.4- Umidade do substrato

O meio foi hidratado com água até aproximadamente 75% de umidade, considerando o volume de água adicionada com o inóculo e com a solução nutriente.

3.5- Medida da atividade enzimática

3.5.1- Atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi avaliada numa mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato 0,2 M pH 5,0, contendo 1% de pectina (Braspectina) com 64-72% de esterificação e 0,2 mL de solução enzimática bruta. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura reacional a 50°C por 10 min., foi quantificado pelo método do DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) proposto por 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.

3.5.2- Atividade de pectina liase (PL)

A mistura de reação para determinar a atividade de PL foi de 0,4 mL de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,5, contendo 1% de pectina



(Braspectina) com 64-72% de esterificação e 0,2 mL de solução enzimática bruta. A incubação foi feita a 65°C por 30 min. e a interrupção da reação ocorreu por adição de 10 mL de HCl a 0,2 M. A quantificação dos produtos foi feita pela leitura da absorbância a 235 nm segundo o método de Albersheim (1966). Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μ mol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5550.



4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitos testes para a seleção do substrato mais adequado para a produção de pectinases pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido. A produção das enzimas foi testada em farelo de trigo e em bagaço de laranja como substratos, além da mistura de bagaço de cana-de-açúcar com cada um destes materiais nas proporções de 10/90%, 30/70% e 40/60% (p/p).

4.1- Produção de pectina liase e poligalacturonase em farelo de trigo e em misturas de bagaço de cana e farelo de trigo

Os ensaios de fermentação foram realizados combinando-se bagaço de cana-de-açúcar e de farelo de trigo nas proporções de 10, 30 e 40% (cana/farelo). Foi considerada como controle, a fermentação na qual foi utilizado somente farelo de trigo como substrato.

Os valores de produção obtidos para pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG), em farelo de trigo e nas diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, ao longo do percurso fermentativo, são mostrados nas Figuras 3 a 6.

Em farelo de trigo, houve considerável produção de PL entre o 12º e 14º dia de cultivo, sendo que o valor máximo obtido foi 1622,0 U/g de substrato, no 12º dia de fermentação. Este substrato também proporcionou boa produção de PG, a qual iniciou-se após o 2º dia e se manteve até o 14º, com o valor máximo de 36,0 U/g atingido no 10º dia (Fig. 3).

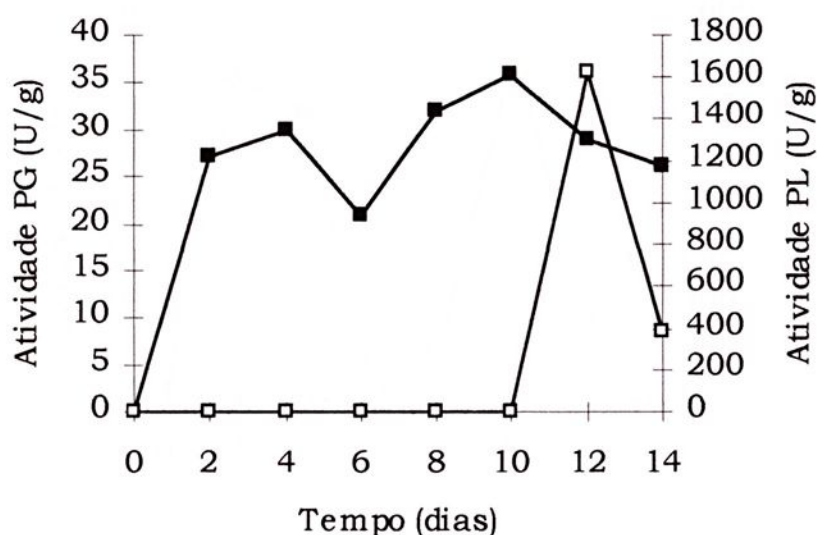


Figura 3: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES, em farelo de trigo. -■- PG; -□- PL.

Na mistura contendo 10% de bagaço de cana e 90% de farelo de trigo, a produção de PL foi pouco menor quando comparada com os valores obtidos em meio composto apenas por farelo de trigo. Esta iniciou-se no 8º dia de fermentação, com valor máximo de 1468,0 U/g, obtido no 10º dia. Um segundo pico foi observado no 14º dia (Fig. 4).

A produção de PG foi muito semelhante àquela obtida em farelo de trigo. Nesta mistura, o período no qual houve detecção de atividade de PG no material fermentado foi menor (entre o 2º e 4º dia de fermentação), sendo que o valor máximo obtido foi 34,0 U/g, no 2º dia (Fig. 4).

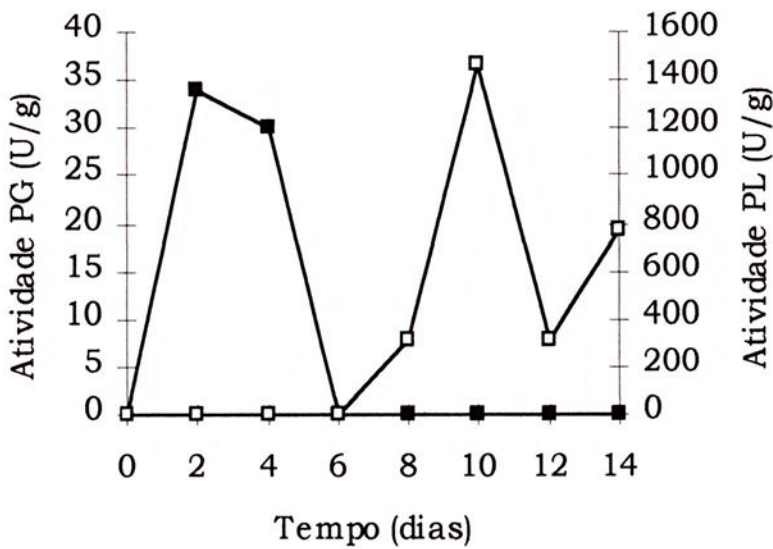


Figura 4: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por 10% bagaço de cana e 90% de farelo de trigo. -■- PG;-□- PL.

A produção de PL na mistura composta por 30% de bagaço de cana e 70% de farelo de trigo mostrou-se diferente daquela obtida em farelo de trigo, tanto quanto aos valores máximos quanto ao perfil de produção ao longo da fermentação. Nesta mistura também houve dois picos de produção, porém o primeiro ocorreu no 6º dia e o segundo no 12º dia de cultivo, quando foi obtida a maior produção da enzima (1236,0 U/g) (Fig. 5). Neste substrato, a produção de PG iniciou-se após o 2º e se estendeu até o 6º dia, sendo que o valor máximo foi de 37,0 U/g, após o 4º dia. Este perfil também foi bastante diferente do observado no meio controle à base de farelo de trigo, embora a produção máxima tenha sido muito semelhante (Fig. 5).

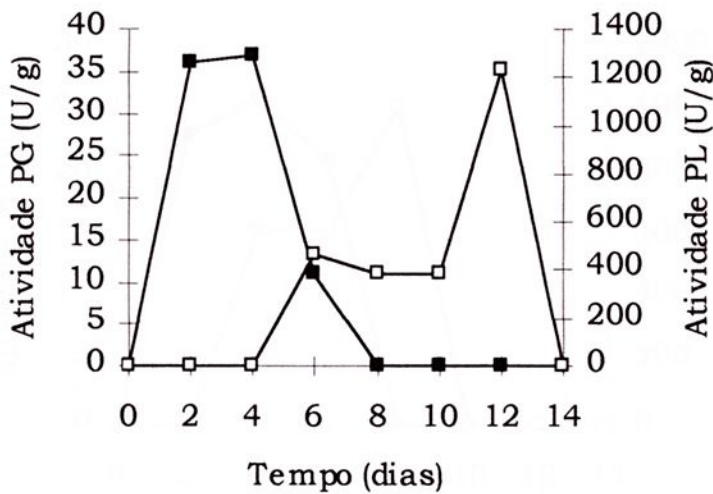


Figura 5: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por 30% de bagaço de cana e 70% de farelo de trigo. -■- PG; -□- PL.

Na mistura contendo 40% de bagaço de cana e 60% de farelo de trigo, a produção de PL pelo fungo foi menor quando comparada com a apresentada em farelo de trigo e nas outras proporções de bagaço de cana e farelo de trigo. Nesta mistura, a produção da enzima iniciou-se após 4 dias de cultivo e se estendeu até o 8º dia, quando foi determinado o valor máximo de atividade enzimática (1004,0 U/g) (Fig. 6).

A de PG também foi menor quando comparada com a obtida em farelo de trigo e nas misturas de bagaço de cana e farelo de trigo. A atividade dessa enzima foi detectada após 2 dias de cultivo e se estendeu até o 6º, sendo que o valor máximo ocorreu no 4º dia (26,0 U/g) (Fig. 6).

Note-se que à medida em que foi diminuída a proporção de farelo de trigo no meio, a produção de PL tendeu a se antecipar, enquanto que a de PG mudou o perfil ou possivelmente o fungo deixou de produzir um segundo tipo da enzima, o qual teria sido detectado em farelo de trigo após o 8º dia do percurso fermentativo.

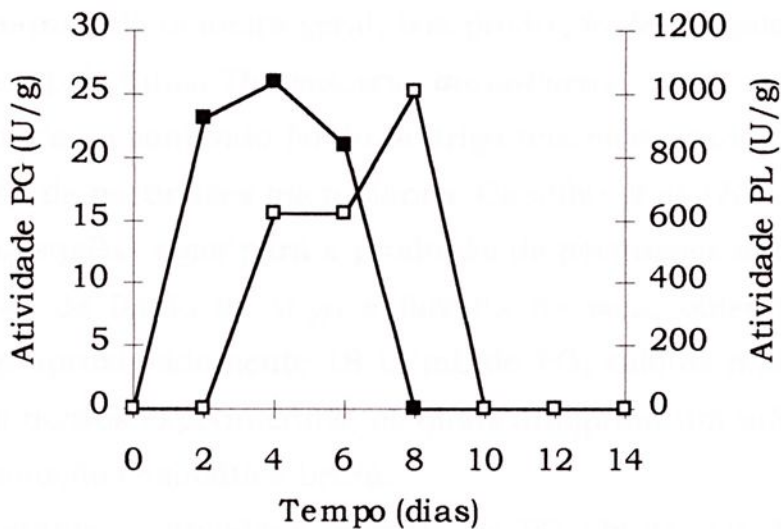


Figura 6: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por 40% de bagaço de cana e 60% de farelo de trigo.
-■- PG; -□- PL.

Os resultados de produção das enzimas obtidos em farelo de trigo e nas diferentes misturas de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar estão sintetizados na tabela 1.

Tabela 1: Produção de poligalacturonase e pectina liase em farelo de trigo e nas diferentes misturas de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar.

Substrato	Poligalacturonase		Pectina liase	
	Produção máxima (U/g)	Dia de cultivo*	Produção máxima (U/g)	Dia de cultivo*
Farelo de trigo	36,0	10	1622,0	12
10% bagaço de cana e 90% farelo de trigo	34,0	2	1468,0	10
30% bagaço de cana e 70% farelo de trigo	37,0	4	1236,0	12
40% bagaço de cana e 60% farelo de trigo	26,0	4	1004,0	8

* Dia em que se observou a produção máxima.

O farelo de trigo e as diferentes combinações de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar utilizadas em nossos experimentos proporcionaram, de maneira geral, boa produção de poligalacturonase e pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*.

Substratos contendo farelo de trigo tem sido usado com sucesso na obtenção de pectinases microbianas. Castilho *et al.* (2000) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para a produção de pectinases através de FES de misturas de farelo de trigo e farinha de soja, obtendo produção máxima de aproximadamente 18 U/mL de PG, valores maiores que os obtidos em nossos experimentos, os quais atingiram um máximo de 5,0 U/mL de solução enzimática bruta.

Entretanto, a atividade máxima de PG obtida por *Thermoascus aurantiacus* foi maior quando comparada com a relatada por Solís-Pereira *et al.* (1993), que estudaram a produção de pectinases por *Aspergillus niger* através de fermentação em estado sólido utilizando pectina sintética como substrato, obtendo 33,0 U/g, após 72 horas de cultivo. Esta também foi maior que a relatada por Zengh e Shetty (2000), obtida por *Lentinus edodes* em fermentação em estado sólido de polpa de morango (29,4 U/g) e de maçã (20,1 U/g).

Soares *et al.* (2001) obtiveram boa produção de pectinases por cinco linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus*, através de FES de farelo de trigo. A atividade máxima de exo-PG obtida foi 40,0 U/g, sendo próxima à obtida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* nesse meio (36,0 U/g). Quanto à de PL, a atividade máxima obtida pelo fungo foi maior (1.622,0 U/g) que o valor obtido pela linhagem *Bacillus* sp (1.000,0 U/g). A atividade máxima desta enzima também foi muito mais elevada que a obtida por *Aspergillus niger* (70,0 U/g), relatada por Acuña-Argüelles *et al.* (1995) na fermentação sólida de pectina sintética misturada com bagaço de cana-de-açúcar, utilizado como suporte inerte.

Embora a comparação de resultados de pesquisas de diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, há que se

considerar as diferenças de metodologia de fermentação e de dosagem de atividade enzimática usadas. Ainda, quando se trabalha com fermentação em estado sólido, o tipo de substrato utilizado, sua capacidade de retenção das proteínas por adsorção das mesmas às fibras e a relação entre volume de solvente usado por grama de material fermentado, são fatores cruciais no momento da comparação dos dados.

O farelo de trigo tem sido usado com sucesso também na produção de outras enzimas hidrolíticas, como celulasas (JECU, 2000), amilases (MULIMANI *et al.*, 2000; RABALHO, 2002), proteases (AIKAT e BHATTACHARYYA, 2000; COURI *et al.*, 2000) e xilanases (COURI *et al.*, 2000; KALOGERIS *et al.*, 1998). O mesmo ocorre com o bagaço de cana-de-açúcar, que tem mostrado ser um substrato propício à produção de diversas enzimas, principalmente celulasas (DE-PAULA *et al.*, 1999; MANONMANI e SREEKANTIAH, 1987; MENEZES e HENNIES, 1994) e xilanases (JAIN, 1995).

4.2- Produção de pectina liase e poligalacturonase em bagaço de laranja e em misturas de bagaço de cana e de laranja

Os ensaios de fermentação foram realizados combinando-se bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de laranja nas proporções de 10/90%, 30/70% e 40/60% (cana/laranja). Foi usado como controle a fermentação na qual foi utilizado somente bagaço de laranja como substrato. Os valores de produção de pectina liase e poligalacturonase nestes substratos são mostrados nas figuras 7 a 10.

Quando foi utilizado o bagaço de laranja como único substrato (sem mistura com bagaço de cana) a produção de PL iniciou-se após 6 dias de cultivo, sendo detectada até o 14º, com a maior produção (1160,0 U/g) no 12º dia (Fig. 7).

Com relação à PG, este substrato proporcionou maior produção da enzima quando comparada com a obtida em farelo de trigo. Esta foi



detectada no material fermentado no período de 2 a 8 dias, com o valor máximo de 43,0 U/g, no 6º dia (Fig. 7).

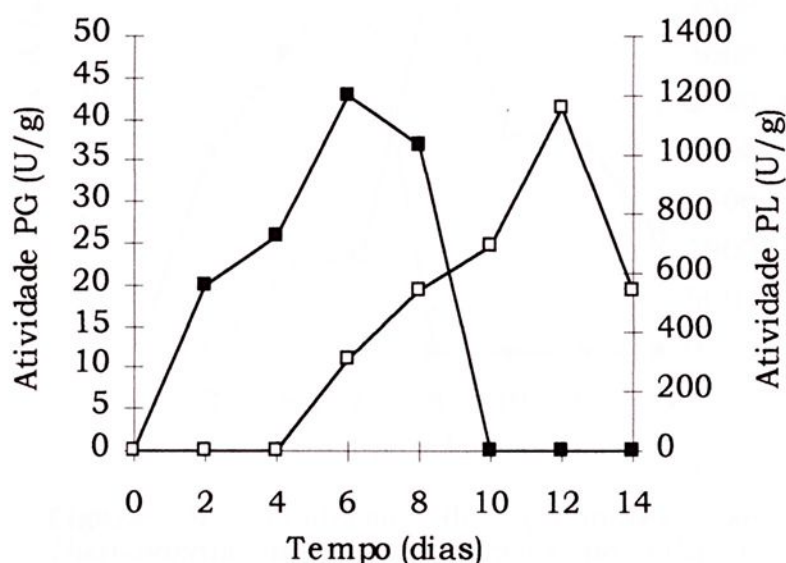


Figura 7: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por bagaço de laranja.
-■- PG; -□- PL.

Os meios compostos por bagaço de cana-de-açúcar e de laranja proporcionaram boa produção de pectina liase e poligalacturonase, sendo que a de pectina liase foi acentuadamente maior nesses meios do que naqueles compostos por bagaço de cana e farelo de trigo.

Em meio composto por 10% de bagaço de cana e 90% de laranja a produção de PL iniciou-se após 4 dias e foi detectada até o 14º, com pico máximo de 4018,0 U/g, observado no 8º dia (Fig. 8).

A produção de PG foi menor do que aquela obtida no meio de bagaço de laranja. Esta iniciou-se após o 2º dia de cultivo e se estendeu até o 6º dia, tempo no qual ocorreu o seu pico de produção (32,0 U/g) (Fig. 8).

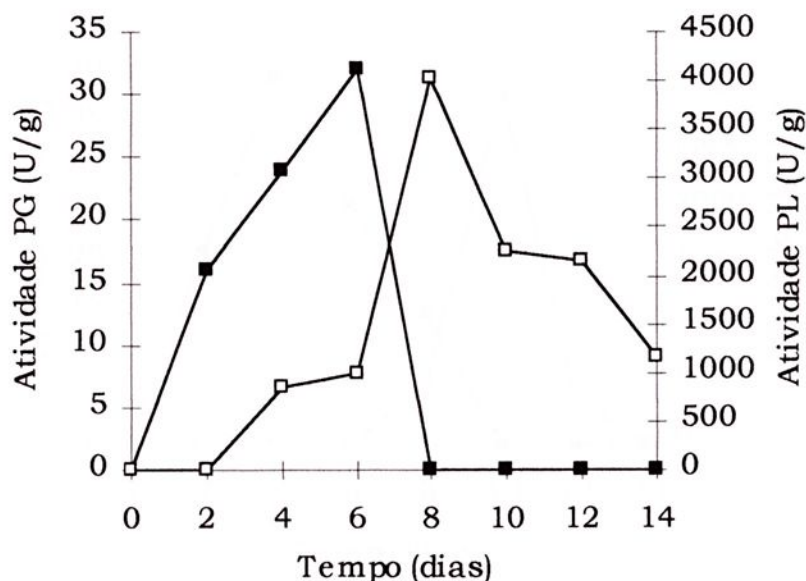


Figura 8: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por 10% de bagaço de cana e 90% de laranja. -■- PG; -□- PL.

Na fermentação da mistura composta por 30% de bagaço de cana e 70% de laranja, a produção de PL iniciou-se no 8º dia e estendeu-se até o 12º, com produção máxima de 3013,0 U/g no 10º dia (Fig. 9).

A de PG ocorreu no período de 2 a 8 dias, com o pico de 40,0 U/g, detectado no 4º dia de cultivo (Fig. 9).

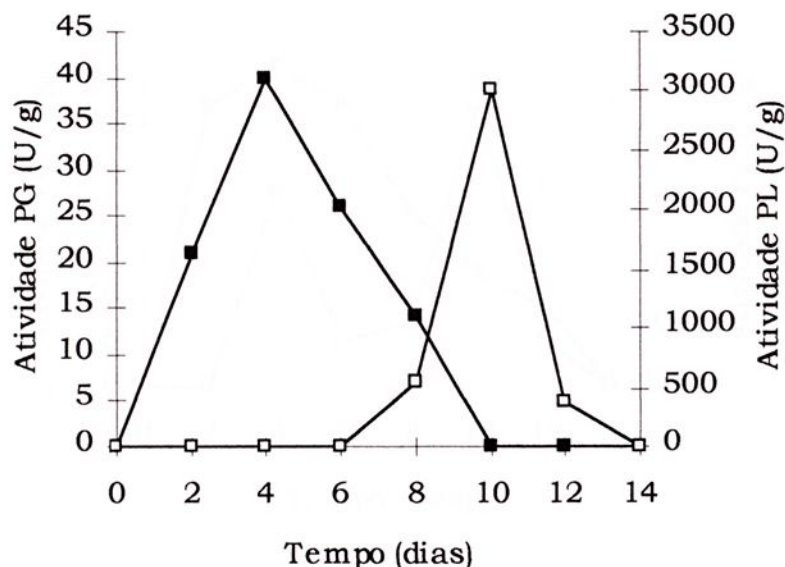


Figura 9: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por 30% de bagaço de cana e 70% de laranja. -■- PG; -□- PL.

Quando o substrato utilizado foi a mistura de 40% de bagaço de cana e 60% de laranja, houve dois picos de produção de PL. O primeiro ocorreu no 4º dia (1700,0 U/g) e o segundo, no 10º dia (2395,0 U/g) (Fig.10).

A de PG iniciou-se após o 2º dia, sendo a atividade da enzima detectada até o 12º. Nesta mistura, o valor máximo de atividade foi 37,0 U/g, após o 4º dia (Fig. 10).

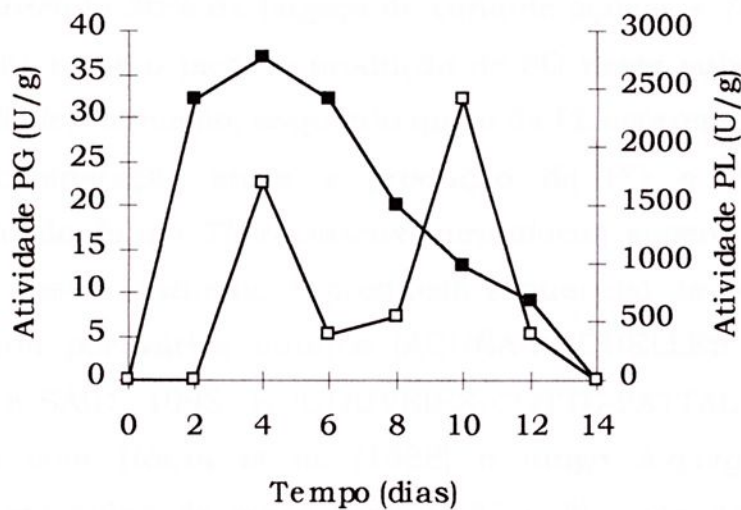


Figura 10: Produção de pectinases por *Thermoascus aurantiacus* através de FES de substrato composto por 40% de bagaço de cana e 60% de laranja. -■- PG; -□- PL.

Os resultados de produção das enzimas obtidos em bagaço de laranja e nas diferentes misturas de bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar estão sintetizados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de produção máxima de poligalacturonase e pectina liase em bagaço de laranja e nas diferentes misturas de bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar.

Substrato	Poligalacturonase		Pectina liase	
	Produção máxima (U/g)	Dia de cultivo*	Produção máxima (U/g)	Dia de cultivo*
Bagaço de laranja	43,0	6	1160,0	12
10% bagaço de cana e 90% bagaço de laranja	32,0	6	4018,0	8
30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja	40,0	4	3013,0	10
40% bagaço de cana e 60% bagaço de laranja	37,0	4	2395,0	10

* Dia em que se observou a produção máxima.

Analisando-se em conjunto as produções de PG e PL, conclui-se que o melhor substrato para a produção de ambas as enzimas foi a mistura contendo 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% bagaço de laranja, sendo que o pico de produção de PG neste substrato ocorreu em 4 dias de fermentação, enquanto que o da PL ocorreu em 10 dias.

A comparação entre a produção de PG e PL durante o crescimento do fungo *Thermoascus aurantiacus* sugere uma indução sequencial destas enzimas. A produção sequencial de pectinases tem sido relatada por vários autores (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1995; FONSECA e SAID, 1995; HUGOUVEIEX-COTTE-PATTAL *et al.*, 1996). De acordo com Hours *et al.* (1988) o fungo *Aspergillus foetidus* crescendo em polpa de maçã produz PG e PL após 48 e 96 horas, respectivamente.

Fonseca e Said (1995) também relataram a produção sequencial de um complexo pectinolítico produzido por *Penicillium frequentans*. Resultados similares foram encontrados por Maldonado *et al.* (1986) na produção de enzimas hemicelulolíticas.

A utilização de bagaço de laranja para a obtenção de pectinases através de FES tem sido testada com sucesso para *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum* (RIZZATTO, 1999). Garzón e Hours (1992) também conseguiram alta produção de endo-poligalacturonase através da fermentação sólida de casca de laranja pelo fungo *Aspergillus foetidus* (1687,0 U/g).

Ismail (1996) relatou que este substrato proporcionou boa produção de endo-poligalacturonase, celulase e xilanase por seis linhagens fúngicas. Segundo o autor, a possibilidade de se utilizar o bagaço de laranja para a obtenção de pectinases garante processos com menor custo de produção. O autor destaca ainda que é necessária muita pesquisa sobre as condições de produção de pectinases nesse substrato e ressalta a importância de se obter outras linhagens fúngicas produtoras de enzimas com características apropriadas para a indústria.



Segundo Mahmood *et al.* (1998), as indústrias de processamento de suco de laranja estão entre as mais importantes do ramo alimentício e produzem grande quantidade de resíduos derivados do processamento das frutas. Os autores ressaltam que o aproveitamento destes resíduos pode representar uma alternativa altamente viável economicamente e que a fermentação microbiana deste material pode produzir uma grande variedade de produtos de alto valor agregado, dentre os quais destacam-se enzimas, ácido cítrico e ácido glutâmico, dentre outros.

Garzon e Hours (1992) também destacaram a importância da realização de mais pesquisas relacionadas ao aproveitamento deste resíduo para a produção de pectinases, principalmente relacionadas ao estudo da suplementação deste material com outras fontes nutrientes e da composição do “pool” enzimático que este material pode proporcionar, quando usado como substrato em processos fermentativos.



VII- CAPÍTULO II: EFEITOS DE DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES E TEMPO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE E PECTINA LIASE EM FRASCOS ERLLENMEYER E EM EMBALAGEM DE POLIPROPILENO

1- INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas são naturalmente degradadas por pectinases, que podem ser produzidas por uma grande variedade de organismos, como vegetais superiores, nematóides parasitas de plantas, fungos, bactérias e leveduras (ROMBOUTS e PILNIK, 1978).

Na indústria de alimentos, as pectinases são aplicadas na extração e clarificação de sucos, na clarificação de mosto de vinhos e na maceração e liquefação de frutas e vegetais. Estas também vêm sendo utilizadas na indústria têxtil, facilitando a extração de fibras de celulose e a degomagem de fibras (KAPOOR *et al.*, 2001).

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria para a produção de pectinases. As preparações enzimáticas mais comumente utilizadas são as produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium*, que exibem alta produção de poligalacturonase e pectina liase. No entanto, o estudo de outras linhagens fúngicas produtoras destas enzimas é de fundamental importância, quando pretende-se produzir enzimas com características distintas e apropriadas à aplicações industriais específicas (FOGARTY e WARD, 1972; ALKORTA *et al.*, 1998).

A capacidade destes microrganismos crescerem em materiais ligno-hemi-celulósicos é uma característica importante que permite o aproveitamento de resíduos vegetais como substrato para produção de biomassa e bioprodutos. A matéria orgânica presente nos resíduos agrícolas e agro-industriais, como o bagaço de cana-de-açúcar e o bagaço de laranja, aumenta dia a dia, tornando-se um problema com

relação a espaço para depósito e poluição do meio ambiente (PANDEY *et al.*, 2000a; ISMAIL, 1996).

Análises químicas de bagaço de laranja seco revelaram que este material é composto por pectina (~23,5%), celulose (~19,2%), hemicelulose (~34,0%), materias solúveis (~21,5%) e cinzas (~1,8%) (Ismail, 1996). Já o bagaço de cana-de-açúcar é constituído por celulose (~ 50%), hemicelulose e lignina (~ 25% cada) e cinzas (~2,4%) (PANDEY *et al.*, 2000b). Estes resíduos representam uma fonte de menor custo para o crescimento microbiano, para a produção de biomassa ou enzimas. Na maioria dos casos, um simples enriquecimento destes compostos com uma fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para a produção de quantidades significativas tanto de biomassa microbiana quanto de enzimas (BISARIA e GHOSE, 1981; ELISASHVILI, 1993).



2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação do substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30%/70%), com diferentes fontes de nutrientes sobre a produção das enzimas poligalacturonase e pectina liase em frascos Erlenmeyer e em embalagem de polipropileno;

- Avaliar a produção das enzimas nos tempos de cultivo de 4 e 10 dias, em frascos Erlenmeyer e em embalagem de polipropileno.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Microrganismo

O microrganismo, o meio de manutenção da cultura e o meio para a fermentação em estado sólido estão descritos nos itens 3.1, 3.2.1 e 3.2.2 do capítulo I.

3.2- Estudo da suplementação do meio com nutrientes

Foram estudadas as seguintes fontes de nutrientes como aditivos ao meio de fermentação (p/v):

-Solução nutriente 1: composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%.

-Solução nutriente 2: peptona a 0,5% e $\text{Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% .

-Solução nutriente 3: água de lavagem de farelo de trigo obtida por suspensão de farelo de trigo em água (1:1 p/v), por 30 min., e centrifugação.

-Solução nutriente 4: soro de leite obtido da fabricação de queijo, fornecido pela Cooperativa de Laticínios Colar, São José do Rio Preto-SP

-Solução nutriente 5: “água amarela” obtida do processamento de suco de laranja (Citrovita S/A Catanduva-SP).

-Solução nutriente 6: composta por uma suspensão 0,5% de farinha de soja em água.

-Solução 7 (controle): água.

3.3- Recipientes de fermentação

A produção de pectinases ocorreu em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g do substrato (item 3.2.2 do capítulo I) e em embalagem de polipropileno, contendo 30 g deste material. A embalagem de polipropileno, com 30 cm x 20 cm, teve sua abertura fechada com um tubo de PVC de 5 cm de diâmetro, cuja luz foi fechada com algodão.

3.4- Fermentação em estado sólido

Na fermentação em frascos Erlenmeyer, o material foi inoculado com suspensão micelial de cultura de 4 dias em meio Sabouraud suspendida em 10 mL de água destilada estéril. Após a inoculação, 10 ml das soluções nutrientes a serem testadas foram adicionados em cada frasco.

As embalagens de polipropileno foram inoculadas com 60 mL da suspensão micelial, após o que 60 ml de solução nutriente foram adicionados em cada embalagem.

O cultivo foi feito a 50°C durante 14 dias. Em intervalos de 48 horas, um frasco e uma embalagem correspondente a cada tratamento foram retirados. Em cada um foi adicionado 8 mL de água destilada por grama de material fermentado, sendo posteriormente agitados durante 40 minutos em "shaker", a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 1000 g durante 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

3.5- Umidade do substrato

O meio foi hidratado com água até aproximadamente 75% de umidade, considerando o volume de água adicionada com o inóculo e com a solução nutriente utilizada

3.6- Planejamento experimental para o estudo dos fatores solução nutriente e tempo de cultivo

Foram estudados os fatores tempo de cultivo do fungo (4 e 10 dias) e tipos de solução nutriente (citadas no item 3.3), segundo um planejamento fatorial 2x7. Os tratamentos realizados são apresentados na tabela 3. Cada amostra correspondeu a um frasco ou uma embalagem de cultura e os experimentos foram feitos em três repetições.



Tabela 3: Tratamentos aplicados no experimento fatorial 2x7.

Tempo (dias)	Composição do meio
4	Meio base + solução nutriente 1
	Meio base + solução nutriente 2
	Meio base + solução nutriente 3
	Meio base + solução nutriente 4
10	Meio base + solução nutriente 5
	Meio base + solução nutriente 6
	Meio base + água

Meio base= mistura de bagaço de cana e bagaço de laranja na proporção 30/70%.

3.7- Medida da atividade enzimática

3.7.1- Atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi medida conforme descrito no item 3.5.1 do capítulo I. 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.

3.7.2- Atividade de pectina liase (PL)

A atividade de PL foi medida conforme descrito no item 3.5.2 do capítulo I. Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 µmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5550.



4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitos testes de produção das enzimas em frascos Erlenmeyer e em embalagem de polipropileno, com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de cultivo de 4 e 10 dias.

Os experimentos foram feitos em três repetições e, a partir dos dados obtidos, foi realizada uma análise estatística dos resultados, pelo programa Estat.

4.1- Produção das enzimas em frascos Erlenmeyer

4.1.1- Poligalacturonase

Os resultados gerais dos tratamentos aplicados para a produção de poligalacturonase em frascos Erlenmeyer estão apresentados na tabela 4 e na figura 11, na qual pode ser melhor visualizada a influência de cada solução nutriente na produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.



Tabela 4: Produção média de poligalacturonase por *Thermoascus aurantiacus* em Erlenmeyer, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Tratamento	Média (U/g)
4 dias- Solução de sais	21,8
4 dias- Água peptonada	30,0
4 dias- Água de lavagem de farelo de trigo	25,6
4 dias- Soro de leite	14,1
4 dias- Água amarela	14,6
4 dias- Solução de farinha de soja	18,7
4 dias- Água	12,1
10 dias - Solução de sais	14,2
10 dias - Água peptonada	16,2
10 dias - Água de lavagem de farelo de trigo	8,7
10 dias - Soro de leite	2,0
10 dias - Água amarela	1,7
10 dias - Solução de farinha de soja	8,1
10 dias - Água	1,0

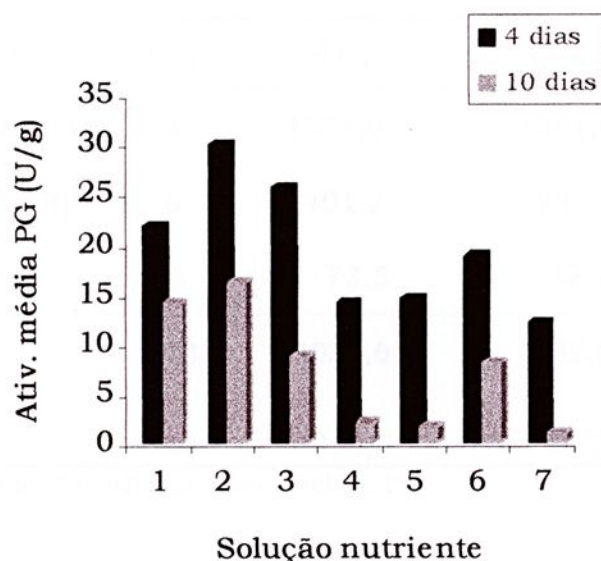


Figura 11: Produção média de poligalacturonase por *Thermoascus aurantiacus* em Erlenmeyer, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Com os dados gerais obtidos com os diferentes tratamentos aplicados, foi feita a análise de variância dos experimentos, a qual é apresentada na tabela 5. A média geral do ensaio foi 13,5 U/g com desvio padrão de 3,6 U/g e coeficiente de variação de 26,4.

Tabela 5: Análise de variância da produção de poligalacturonase em Erlenmeyer em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tempo de incubação (A)	1	1551,9	1551,9	122,2**
Solução nutriente (B)	6	1401,2	233,5	18,4**
Fator A X B	6	73,5	12,2	0,9 ^{NS}
(Tratamentos)	13	3026,6	232,8	
Resíduo	28	355,5	12,7	

NS= não significativo; **significativo ao nível de 1%.

Pode-se observar pelos resultados da análise de variância, que os fatores tempo de incubação e solução nutriente exerceram efeito significativo sobre a produção de poligalacturonase ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que a interação entre os dois fatores não exerceu efeito significativo na produção desta enzima, nas condições estudadas.

A aplicação do teste de Tukey para as médias de produção de PG nos diferentes tempos de cultivo e com a utilização das diferentes fontes de nutrientes indicou que a produção média desta foi maior em 4 dias de incubação (19,6 U/g), quando comparada com a obtida em 10 dias de incubação (7,4 U/g).

Além disso, pode-se observar que as soluções nutrientes que proporcionaram a melhor produção da enzima foram a composta por peptona a 0,5% e Mg SO₄ x 7H₂O a 0,1%, a solução composta por NH₄NO₃ a 0,1%, MgSO₄ x 7H₂O a 0,1% e (NH₄)₂SO₄ a 0,1% e a água de lavagem de farelo de trigo, que não diferiram significativamente entre si (Tab. 6).

Tabela 6: Teste de Tukey para as médias de produção da PG em Erlenmeyer em relação aos fatores tempo de incubação e solução nutriente.

Fator	Média (U/g)
Tempo de incubação (dias)	
4	19,6 A
10	7,4 B
Solução nutriente	
Água peptonada	23,1 A
Solução de sais	18,0 AB
Água de lavagem de farelo de trigo	17,2 AB
Solução de farinha de soja	13,4 BC
Água amarela	8,1 CD
Soro de leite	8,1 CD
Água	6,5 D

A composição dos nutrientes utilizados para sustentar o crescimento microbiano, principalmente relacionados à fonte de nitrogênio, podem influenciar a produção de enzimas microbianas. Para crescer, todos os organismos precisam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes, sendo que os elementos químicos principais para o crescimento das células incluem carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. Estes são necessários tanto para a síntese quanto para as funções normais dos componentes celulares (PELCZAR, 1996).

Em nossos experimentos, a produção de poligalacturonase em Erlenmeyer sofreu grande variação em relação às diferentes soluções nutrientes utilizadas. Resultados similares foram relatados por Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) no estudo da produção de endo e exopoligalacturonase por *Aspergillus* sp. ATHUM-3482. De acordo com os

autores, a produção desta enzima foi maior quando utilizou-se $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte de nitrogênio, em relação à produção obtida com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 e NH_4NO_3 .

Como não houve diferença significativa na produção quando se utilizou a solução composta por peptona a 0,5% e $\text{Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e a solução composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, em Erlenmeyer, esta última foi escolhida para dar continuidade ao trabalho, visto que apresenta menor custo quando comparada a peptona.

A influência de compostos nitrogenados como sulfato, fosfato e nitrato de amônia sobre a produção de pectinases tem sido relatada por vários autores. Sapunova *et al.* (1997) estudaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de pectinases por *Aspergillus alliaceus* e seus resultados mostraram que a melhor fonte foi o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na concentração de 0,7%. Este resultado corrobora os de Larios *et al.* (1989), que concluíram que o sulfato de amônio foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, quando comparado com $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, NaNO_3 e NH_4NO_3 .

Segundo Kalogeris *et al.* (1998), soluções nutrientes contendo sulfato de amônia também mostraram-se eficientes na produção de endoxilanasas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*. Estes dados são similares aos resultados obtidos em nossos experimentos, uma vez que a solução nutriente composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1% proporcionou boa produção de PG e PL por esse fungo.

Portanto, a partir da análise estatística dos dados sobre a produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, conclui-se que o tempo de incubação de 4 dias e a solução de NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1% foi a combinação mais adequada para a produção da enzima.



4.1.2- Pectina liase

Os resultados gerais dos tratamentos aplicados para a produção de pectina liase em frascos Erlenmeyer estão apresentados na tabela 7 e na figura 12, na qual pode ser melhor visualizada a influência de cada solução nutriente na produção de pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias. Como pode ser observado, não houve produção desta enzima em 4 dias fermentação, já em 10 dias, houve boa produção.

Tabela 7: Produção de pectina liase em Erlenmeyer pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em FES no experimento fatorial 2x7.

Tratamento	Média (U/g)
4 dias- solução de sais	0
4 dias- Água peptonada	0
4 dias- Água de lavagem de farelo de trigo	0
4 dias- Soro de leite	0
4 dias- Água amarela	0
4 dias- solução de farinha de soja	0
4 dias- Água	0
10 dias- solução de sais	1810,7
10 dias- Água peptonada	2130,7
10 dias- Água de lavagem de farelo de trigo	2161,3
10 dias- Soro de leite	2314,7
10 dias- Água amarela	2315,7
10 dias- solução de farinha de soja	2158,0
10 dias- Água	620,0

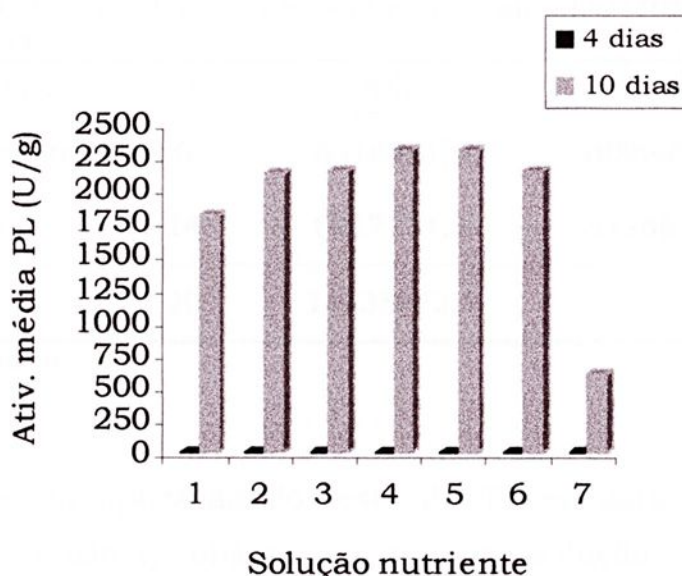


Figura 12: Produção média de pectina liase por *Thermoascus aurantiacus* em Erlenmeyer, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Observando-se a figura, nota-se que não houve diferenças entre a influência das soluções nutrientes entre si. Entretanto, a substituição da mesma por água (controle) levou à uma acentuada redução na produção da PL, sugerindo a necessidade da suplementação do substrato para a produção da mesma.

Como não houve produção de pectina liase em 4 dias de fermentação, as análises estatísticas foram realizadas apenas com os valores obtidos em 10 dias de fermentação e os resultados da análise de variância são apresentados na tabela 8. A média geral do ensaio foi 1930,1 U/g, com um desvio padrão de 756,7 U/g e um coeficiente de variação de 39,21.

Pode-se observar que, ao contrário do que ocorreu para a poligalacturonase, o fator solução nutriente não exerceu efeito significativo na produção desta enzima, nas condições estudadas.

Tabela 8: Análise de variância da produção de pectina liase em Erlenmeyer em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C, no tempo de 10 dias.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Solução nutriente	6	6518441,2	1086406,9	1,9 ^{NS}
Resíduo	14	8017131,3	572652,2	
Total	20	14535572,6		

NS= não significativo.

Através da aplicação do teste de Tukey para as médias de produção da enzima, observa-se que a solução nutriente que proporcionou a maior média foi a água amarela (2315,7 U/g). No entanto, este valor não foi significativamente diferente dos valores obtidos quando as outras soluções foram utilizadas (Tab. 9).

Tabela 9: Teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase em Erlenmeyer.

Fator	Média (U/g)
Solução nutriente	
Água amarela	2315,7 A
Soro de leite	2314,7 A
Água de lavagem de farelo de trigo	2161,3 A
Solução de farinha de soja	2158,0 A
Água peptonada	2130,7 A
Solução de sais	1810,7 A
Água	620,0 A

Nota-se que, ao contrário dos resultados obtidos para a poligalacturonase, a produção de pectina liase em Erlenmeyer foi maior quando se utilizou fontes nutrientes orgânicas de suplementação do

meio. Este resultado é similar ao encontrado por Bansod *et al.* (1993), que conseguiram alta produção de xilanases em meio contendo fontes orgânicas de nitrogênio.

4.2- Produção das enzimas em embalagem de polipropileno

4.2.1- Poligalacturonase

Os resultados gerais dos tratamentos aplicados para a produção de poligalacturonase estão apresentados na tabela 10 e podem ser melhor visualizados na figura 13.

Tabela 10: Produção média de poligalacturonase por *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Tratamento	Média (U/g)
4 dias-Solução de sais	25,4
4 dias- Água peptonada	16,6
4 dias-Água de lavagem de farelo de trigo	12,5
4 dias-Soro de leite	10,0
4 dias-Água amarela	8,7
4 dias-Solução de farinha de soja	13,7
4 dias-Solução Água	10,0
10 dias-Solução de sais	13,7
10 dias- Água peptonada	8,3
10 dias-Água de lavagem de farelo de trigo	9,6
10 dias-Soro de leite	8,7
10 dias-Água amarela	1,0
10 dias-Solução de farinha de soja	3,9
10 dias-Água	5,8

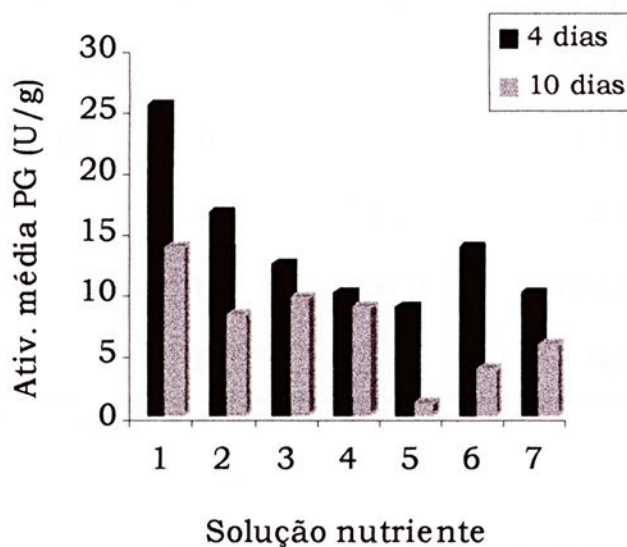


Figura 13: Produção média de poligalacturonase por *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Como pode ser observado, a atividade de PG foi detectada nos meios fermentados em ambos os períodos analisados, embora com mais intensidade nos primeiros 4 dias.

Os dados gerais obtidos indicam diferenças entre os tratamentos aplicados, confirmados pela análise de variância, cujos dados são apresentados na tabela 11. A média geral do ensaio foi 10,6 U/g, com um desvio padrão de 3,1 U/g e um coeficiente de variação de 28,9.

Tabela 11: Análise de variância da produção de poligalacturonase em embalagem de polipropileno em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), a 50°C.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tempo de incubação (A)	1	451,5	451,5	48,3 **
Solução nutriente (B)	6	772,9	128,8	13,8 **
Fator A X B	6	132,7	22,1	2,4 NS
(Tratamentos)	13	1357,1	104,4	
Resíduo	28	261,5	9,3	

NS= não significativo; **significativo ao nível de 1%.

Pode-se observar que os fatores tempo de incubação e solução nutriente exerceram efeito significativo sobre a produção de poligalacturonase ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que a interação entre os dois fatores não exerceu efeito significativo na produção desta enzima, nas condições estudadas.

A aplicação do teste de Tukey para as médias de produção de PG nos diferentes tempos de cultivo e com a utilização das diferentes fontes de nutrientes indicou que a produção média desta foi maior em 4 dias de incubação (13,8 U/g) quando comparada com a obtida em 10 dias de incubação (7,3 U/g).

Além disso, pode-se observar, na tabela 12, que a solução nutriente que proporcionou a melhor produção da enzima foi a composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1% (19,6 U/g).

Tabela 12: Teste de Tukey para as médias dos fatores tempo de incubação e solução nutriente.

Tempo de incubação (dias)	Média (U/g)
4	13,8 A
10	7,3 B

Solução nutriente	
Solução de sais	19,6 A
Água peptonada	12,5 B
Água de lavagem de farelo de trigo	11,0 B
Soro de leite	9,4 BC
Solução de farinha de soja	8,8 BC
Água	7,9 BC
Água amarela	4,9 C

Através dos resultados apresentados para a produção de poligalacturonase, pode-se notar que o tempo de cultivo do fungo e a solução nutriente utilizada influenciaram de maneira muito semelhante a sua produção em frascos Erlenmeyer e em embalagem de polipropileno. Como a produção em frascos Erlenmeyer foi maior que em embalagem de polipropileno, este recipiente foi então selecionado para os estudos posteriores.

4.2.2- Pectina liase

Os resultados gerais dos tratamentos aplicados para a produção de pectina liase em embalagem de polipropileno estão apresentados na tabela 13 e podem ser melhor visualizados através da figura 14.

Tabela 13: Produção média de pectina liase por *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Tratamento	Média (U/g)
4 dias- solução de sais	0
4 dias- Água peptonada	0
4 dias- Água de lavagem de farelo de trigo	0
4 dias- Soro de leite	0
4 dias- Água amarela	0
4 dias- Solução de farinha de soja	0
4 dias- Água	0
10 dias- solução de sais	7151,3
10 dias- Água peptonada	5255,0
10 dias- Água de lavagem de farelo de trigo	1964,0
10 dias- Soro de leite	1964,0
10 dias- Água amarela	3042,7
10 dias- Solução de farinha de soja	6360,7
10 dias- Água	1083,3

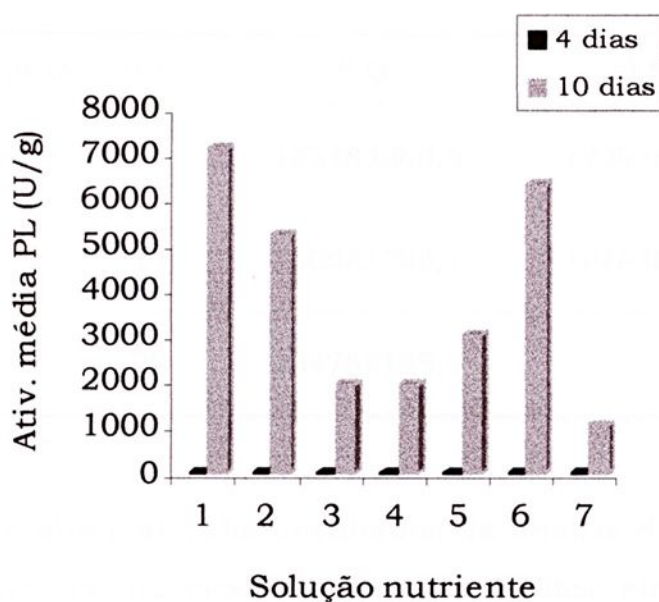


Figura 14: Produção média de pectina liase por *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, contendo meio composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja (30/70%), com a adição de diferentes soluções nutrientes, nos tempos de incubação de 4 e 10 dias.

Da mesma forma que o observado nas fermentações em Erlenmeyer, houve produção de PL apenas após 10 dias de fermentação. Entretanto, o tipo de solução nutriente usado influenciou diferentemente a produção da enzima, se comparado os dois recipientes de fermentação.

Com os dados gerais obtidos com os diferentes tratamentos aplicados, foi feita a análise de variância dos experimentos, a qual é apresentada na tabela 14. A média geral do ensaio foi 3831,6 U/g, com desvio padrão de 3284,0 U/g e um coeficiente de variação de 85,71.

Tabela 14: Análise de variância da produção de pectina liase em embalagem de polipropileno, em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%) a 50°C.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Solução nutriente	6	103782360,5	17297060,1	1,6 NS
Resíduo	14	150985792,7	10784699,5	
Total	20	254768153,1		

NS= não significativo.

Pode-se observar pelos resultados da análise de variância que, assim como ocorreu na produção de pectina liase em Erlenmeyer, o fator solução nutriente não exerceu efeito significativo na produção desta enzima em embalagem de polipropileno, nas condições estudadas.

A aplicação do teste de Tukey, para as médias de produção de pectina liase com a utilização das diferentes fontes de nutrientes, indicou que a produção média desta enzima foi maior quando utilizou-se solução de sais composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1% (7151,3 U/g), não sendo uma produção significativamente diferente quando se utilizou as demais soluções (Tab. 15).

Tabela 15: Teste de Tukey para as médias do fator solução nutriente.

Fator	Média (U/g)
Solução nutriente	
Solução de sais	7151,3 A
Solução de farinha de soja	6360,7 A
Água peptonada	5255,0 A
Água amarela	3042,7 A
Água de lavagem de farelo de trigo	1964,0 A
Soro de leite	1964,0 A
Água	1083,3 A

Portanto, a partir da análise estatística dos dados sobre a produção de pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em embalagem de polipropileno, pode-se observar que os fatores tempo de incubação de 10 dias e solução de NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1% tornaram a produção da enzima mais eficiente.

Os recipientes estudados na produção de pectinases pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* influenciaram de maneira diferente a produção das enzimas, visto que a de PG foi maior quando o fungo foi cultivado em Erlenmeyer, enquanto que a de PL foi maior quando este foi cultivado em embalagem de polipropileno.

Resultados similares foram obtidos por Menezes e Hennies (1994), no estudo da produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* através de fermentação sólida utilizando bagaço de cana-de-açúcar, em Erlenmeyer e em fermentador rotativo. A atividade de β -glicosidase e xilanase foram superiores em Erlenmeyer, enquanto que a de endoglucanase foi maior em fermentador rotativo.

Diferentes recipientes podem diferir em algumas propriedades importantes, como concentração de oxigênio e transferência de calor, influenciando o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a produção enzimática. Dessa forma, a seleção de recipientes (fermentadores) torna-se importante nos estudos de otimização das condições de produção de enzimas. Diferentes fermentadores têm sido usados para a obtenção de enzimas microbianas por FES, oferecendo processos simples e de baixo custo para a sua produção (AIDOO *et al.*, 1982).

Ao contrário do que ocorreu para a poligalacturonase, a diferença de produção de PL não foi significativa, quando relacionada às diferentes soluções nutrientes utilizadas. No entanto, a solução de NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, que proporcionou a maior média de produção da enzima, foi selecionada para os estudos posteriores, tanto para a PG quanto para a PL.

VIII- CAPÍTULO III: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DAS PECTINASES

1- INTRODUÇÃO

As pectinases são um grupo de enzimas que degradam as substâncias pécticas, quebrando ligações glicosídicas (poligalacturonase, pectina liase e pectato liase) ou removendo grupamentos metil (pectinesterase) das cadeias de ácido poligalacturônico (CASTILHO *et al.*, 2000).

Na indústria de alimentos, as pectinases podem ser aplicadas na extração (quebrando as moléculas de pectina e melhorando o rendimento da extração), clarificação e despectinização de sucos de frutas, melhorando o aspecto e qualidade do produto, na extração de óleo vegetal, bem como na produção de pastas e purês vegetais. Na indústria têxtil, têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o ramí, por ajudar na liberação das fibras de celulose, após a quebra da pectina. Estas enzimas também são utilizadas na produção de vinhos e na fermentação do café, cacau e fumo (BRAVO *et al.*, 2000).

As pectinases podem ser produzidas por fermentação submersa (FSM) ou fermentação em estado sólido (FES), utilizando diversos resíduos agrícolas e agro-industriais. Como na fermentação em estado sólido os microrganismos crescem em condições mais similares às do seu hábitat natural, estes são capazes de produzir certas enzimas e metabólitos que podem não ser produzidas ou então são produzidas em pequenas quantidades em fermentação submersa (JECU, 2000). No processo de fermentação em estado sólido, vários aspectos devem ser considerados para o desenvolvimento de um bioprocessos. Estes incluem a seleção do microrganismo e seu substrato, a otimização de

parâmetros do processo e o isolamento e purificação do produto desejado (PANDEY, 2002).

A produção de pectinases por microrganismos é altamente influenciada pelas condições de cultivo, em particular pelo meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e umidade inicial do substrato e temperatura de cultivo do microrganismo (AGUILAR *et al.*, 1991).

Com relação ao nível de umidade inicial do substrato, este é um dos parâmetros que mais afetam a biossíntese de enzimas pectinolíticas microbianas por fermentação em estado sólido (BEROVIC e OSTROVERSNIK, 1997). Em substrato com baixa quantidade de água disponível, os fungos sofrem modificações na membrana celular, que levam à limitação de transporte pela mesma, afetando as funções celulares (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1994). Além disso, a baixa disponibilidade de água pode levar a uma redução na acessibilidade aos nutrientes, resultando em um crescimento microbiano pobre. Por outro lado, elevados níveis de umidade afetam a porosidade do substrato e impedem a penetração de oxigênio no mesmo, interferindo assim no crescimento microbiano aeróbio (PANDEY, 2002).

A temperatura constitui outro fator fundamental que afeta o crescimento e a produção de metabólitos microbianos. Estes processos são dependentes de reações químicas que são afetadas pela temperatura, uma vez que a temperatura influencia a ação enzimática, a permeabilidade da membrana e a integridade dos componentes celulares (PELCZAR, 1996). Segundo Denison (2000), o pH do meio também influencia diretamente a produção de metabólitos, uma vez que a expressão de vários genes é regulada pelo pH do ambiente no qual o microrganismo se desenvolve. Além disso, a atividade catalítica das enzimas pode ser alterada de acordo com a estabilidade destas ao pH.

Dessa forma, é fundamental o conhecimento dos parâmetros que afetam a síntese do produto que se deseja obter em um determinado processo fermentativo, considerando que tais condições podem variar

entre os diferentes microrganismos, assim como para os diferentes produtos. Dessa forma, a otimização destes parâmetros é um passo muito importante para conseguir um bom rendimento do produto desejado (BRAVO *et al.*, 2000).



2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de diferentes valores de pH inicial do substrato composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja (p/p), sobre a produção de poligalacturonase e pectina liase;

- Avaliar a influência da umidade inicial do substrato, sobre a produção das enzimas;

- Avaliar a influência da temperatura de incubação do fungo, sobre a produção das enzimas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Nesta etapa, foi estudada a influência de fatores físico-químicos (pH, umidade e temperatura) na produção das pectinases, visando-se avaliar o efeito destes fatores na produção das enzimas, uma vez que o crescimento microbiano e a conseqüente formação de metabólitos é dependente dos fatores citados.

3.1- Microrganismo

O microrganismo utilizado, o meio de manutenção e o meio para fermentação em estado sólido estão descritos nos itens 3.1, 3.2.1 e 3.2.2 do capítulo I.

3.2- Fermentação em estado sólido (FES)

Os ensaios de fermentação para a produção de poligalacturonase ocorreram em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g do substrato citado no item 3.2.2 do capítulo I. O material foi inoculado com 10 mL de suspensão micelial de cultura de 4 dias em meio Sabouraud, suspendida em água destilada estéril. Após a inoculação, 10 mL de solução composta por 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% de NH_4NO_3 e 0,1% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados em cada frasco. O cultivo foi feito a 50°C e 55°C.

A fermentação para a produção de pectina liase ocorreu em embalagens de polipropileno, de 20 x 30 cm, contendo 30 g do mesmo substrato. O material foi inoculado com 60 mL da suspensão micelial e, após a inoculação, 60 ml de solução nutriente composta por 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% de NH_4NO_3 e 0,1% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados em cada embalagem. O cultivo foi feito a 50°C e 55°C, durante 10 dias.

Após os dias de fermentação, os frascos ou embalagens foram retirados e em cada um foram adicionados 8 mL de água destilada por grama de material fermentado, sendo posteriormente agitados durante



40 minutos em “shaker”, a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 1000 g durante 15 minutos a 10°C e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

3.3- Planejamento experimental para o estudo de fatores físico-químicos

Nos testes de avaliação da influência de fatores físico-químicos na produção de pectinases, foram avaliadas as temperaturas de incubação de 50 e 55°C, umidade inicial do substrato de 70 e 80% e valores de pH de 5,0, 5,5 e 6,0. Os pH do meio foram corrigidos com tampão citrato/NaOH 50 mM. A verificação do pH do substrato foi realizada através da suspensão do meio em água e medido o pH da mistura em pHmetro. Os experimentos foram feitos em três repetições, segundo um planejamento fatorial 3x2x2. Os tratamentos realizados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Tratamentos aplicados no experimento fatorial 3x2x2.

pH inicial do substrato	Umidade inicial do substrato (%)	Temperatura de incubação (°C)
5,0	70	50
	80	55
5,5	70	50
	80	55
6,0	70	50
	80	55

3.4- Medida da atividade enzimática

3.4.1- Atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi medida conforme descrito no item 3.5.1 do capítulo I. 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.

3.4.2- Atividade de pectina liase (PL)

A atividade de PL foi medida conforme descrito no item 3.5.2 do capítulo I. Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5550.



4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes para avaliar a influência dos seguintes fatores físico-químicos sobre a produção de pectinases: pH, umidade inicial do substrato e temperatura de fermentação.

Os experimentos foram feitos em três repetições e a partir dos dados obtidos, foi realizada uma análise estatística dos resultados pelo programa Estat.

4.1- Poligalacturonase

Os resultados gerais dos tratamentos aplicados, sobre a produção de poligalacturonase, estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em FES no experimento fatorial 3x2x2, na combinação de diferentes fatores físico-químicos.

Tratamentos	Média (U/g)
pH 5,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 50° C	40,0
pH 5,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 55° C	27,3
pH 5,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 50° C	34,5
pH 5,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 55° C	17,0
pH 5,5 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 50° C	32,8
pH 5,5 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 55° C	14,9
pH 5,5 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 50° C	23,1
pH 5,5 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 55° C	15,4
pH 6,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 50° C	29,2
pH 6,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 55° C	17,1
pH 6,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 50° C	17,5
pH 6,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 55° C	21,2

Com os dados obtidos dos diferentes tratamentos aplicados, foi feita a análise de variância dos experimentos, a qual é apresentada na tabela 18. A média geral do ensaio foi 24,2 U/g, com desvio padrão de 4,3 U/g e coeficiente de variação de 17,8.

Tabela 18: Análise de variância da produção de poligalacturonase em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), em diferentes condições de pH, umidade e temperatura de incubação.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	F
pH (A)	2	554,9	277,5	15,0 **
Umidade (B)	1	262,9	262,9	14,2 **
Temperatura (C)	1	1029,3	1029,3	55,7 **
A x B	2	27,9	13,9	0,7 NS
A x C	2	199,8	99,9	5,4 *
B x C	1	112,7	112,7	6,1 *
A x B x C	2	170,1	85,1	4,6 *
(Tratamentos)	11	2357,9	214,3	
Resíduo	24	443,2	18,5	

NS= não significativo; *= significativo ao nível de 5%; **= significativo ao nível de 1%.

Através dos resultados da análise de variância pode-se observar que todos os fatores, quando isolados, exerceram efeito significativo sobre a produção de PG, em nível de 1% de probabilidade. Pode-se observar também, que a interação destes exerceu efeito significativo em nível de 5% de probabilidade, exceto para a interação entre pH e umidade, que não foi significativa.

A aplicação do teste de Tukey para as médias de produção da enzima, nas diferentes condições físico-químicas estudadas, mostrou que o pH inicial do substrato mais adequado foi 5,0, o qual proporcionou atividade de 29,7 U/g, seguido dos pH 5,5 e 6,0, cujas

atividades enzimáticas foram de 21,5 e 21,2 U/g, respectivamente (Tab. 19).

Com relação à umidade inicial do substrato, pode ser observado que na fermentação cujos substratos foram hidratados até 70% de umidade, houve maior produção de PG quando comparada com aquela a 80%. A produção média na primeira foi de 26,9 U/g, enquanto que na segunda este valor foi de 21,5 U/g (Tab. 19)

Quanto à influência da temperatura de incubação do fungo, a produção média de poligalacturonase foi bem maior quando este foi incubado a 50°C (29,5 U/g). A 55°C este valor foi de 18,8 U/g (Tab. 19).

Tabela 19: Teste de Tukey para as médias de produção de poligalacturonase nos diferentes fatores físico-químicos estudados.

Fator	Média (U/g)
pH inicial do substrato	
5,0	29,7 A
5,5	21,5 B
6,0	21,2 B
Umidade inicial do substrato	
70%	26,9 A
80%	21,4 B
Temperatura de incubação	
50°C	29,5 A
55°C	18,8 B

Com o desdobramento do fator temperatura de incubação dentro do fator pH inicial do substrato, observou-se que a temperatura

influenciou significativamente a produção de poligalacturonase, ao nível de 1% de probabilidade, nos valores de pH 5,0 e 5,5. Já quando o pH do substrato foi 6,0, a temperatura não influenciou significativamente a produção da enzima (Tab. 20).

Tabela 20: Desdobramento do fator temperatura de incubação dentro do fator pH inicial do substrato.

Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M.	F
Temperatura em pH 5,0	1	685,5	685,5	37,1 **
Temperatura em pH 5,5	1	491,5	491,5	26,6 **
Temperatura em pH 6,0	1	52,1	52,0	2,8 NS
	(3)	(1229,1)		

NS= não significativo; **= significativo ao nível de 1%.

Através da aplicação do teste de Tukey para as médias de produção da PG em cada valor de pH, pode-se observar que em todos os valores de pH a maior atividade da enzima ocorreu na temperatura de 50°C (Tab. 21).

Tabela 21: Teste de Tukey para as médias no fator temperatura de incubação dentro de cada valor de pH inicial do substrato.

pH	Temperatura	Média (U/g)
5,0	50°C	37,3 A
	55°C	22,2 B
5,5	50°C	27,9 A
	55°C	15,2 B
6,0	50°C	23,3 A
	55°C	19,2 A

Assim, pode-se concluir que, dentre os fatores pH inicial do substrato e temperatura de incubação, as condições mais adequadas para a produção de poligalacturonase são, respectivamente, pH 5,0 e temperatura de 50°C.

Segundo Aguilar *et al.* (1991), a produção de enzimas microbianas é altamente influenciada pelo pH do meio de cultura, sendo amplas as evidências deste fato para vários tipos de microrganismos. Berovic e Ostroveršnic (1997) relataram alta produção de poligalacturonase e pectinesterase pelo fungo *Aspergillus niger*, através de fermentação de polpa de maçã com pH inicial 4,0. Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) relataram que a maior produção de poligalacturonase por *Aspergillus* sp ATHUM-3482 ocorreu quando o fungo foi cultivado em meio com pH inicial 5,0. Este foi o mesmo valor encontrado em nossos experimentos com o fungo *Thermoascus aurantiacus*, na produção desta enzima.

A produção de exo-poligalacturonase por *Aspergillus* sp CH-Y-1043 através de fermentação submersa também mostrou ser influenciada por este fator (AGUILAR *et al.*, 1991). Segundo Ueda *et al.* (1982), a produção de pectinesterase, poligalacturonase e pectina liase por *Aspergillus oryzae* A-3 também varia de acordo com o pH inicial do meio. Segundo os autores, as diferenças na produção estariam relacionadas com a estabilidade das enzimas nos diferentes valores de pH.

A influência do pH de substratos compostos por resíduos agroindustriais é relatada também para outras enzimas, tais como celulasas e xilanases (ABD EL-NASSER *et al.*, 1997; JECU, 2000).

Embora o pH seja um dos fatores mais críticos na fermentação em estado sólido, o seu controle durante a fermentação dificilmente é conseguido, devido à heterogeneidade e a consistência dos substratos utilizados. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca de pH, podem ser utilizados substratos com uma boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a umidificação do substrato (DEL BIANCHI, 1990).



A influência da temperatura de crescimento do microrganismo em processos fermentativos é também reportada por vários autores. Gaiotou-Panayotou *et al.* (1997) relataram que a produção de poligalacturonase foi muito afetada pela temperatura de crescimento do fungo *Aspergillus* sp ATHUM. Os resultados mostraram que, crescendo a 25°C, a produção da enzima foi de 3,0 U/ml, enquanto que a 20°C, este valor foi reduzido praticamente à metade. Berovic e Ostroversnic (1997) relataram que, quando o fungo *Aspergillus niger* crescia a 35°C, a produção de pectinesterase e poligalacturonase era alta, enquanto que em temperaturas superiores a produção decrescia.

Resultados similares foram encontrados por Jecu (2000), que reportou que a produção de endoglucanase por este mesmo microrganismo não foi muito afetada, quando o fungo foi cultivado na faixa de temperatura entre 28°C e 34°C, porém em temperaturas mais elevadas houve decréscimo na sua produção, provavelmente devido à inativação da enzima pela temperatura.

A produção de pectinases microbianas têm sido intensivamente estudada, porém a grande maioria das pesquisas tem focado a produção destas enzimas por linhagens fúngicas mesofílicas, principalmente pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (PANDEY *et al.*, 2000a). Por outro lado, são poucos os relatos na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas (MAHESHWARI *et al.*, 2000).

Através do desdobramento do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação, observa-se que a 50°C houve diferença significativa na produção de PG, ao nível de 1% de probabilidade. Por outro lado, a 55°C esta diferença não foi significativa (Tab. 22).

Tabela 22: Desdobramento do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação.

Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M.	F
Umidade em temperatura de 50°C	1	360,0	360,0	19,5 **
Umidade em temperatura de 55°C	1	15,7	15,7	0,8 NS
	(2)	(375,7)		

NS= não significativo; **= significativo ao nível de 1%.

Com a aplicação do teste de Tukey, observa-se que a 50°C a umidade que proporcionou maior atividade da poligalacturonase foi 70% (34,0 U/g). Com 80% de umidade inicial do substrato, a atividade da enzima foi de 25,0 U/g (Tab. 23).

Tabela 23: Teste de Tukey para médias do fator umidade dentro de cada temperatura de incubação.

Temperatura	Umidade	Média (U/g)
50°C	70%	34,0 A
	80%	25,0 B
55°C	70%	19,7 A
	80%	17,9 A

Como pode-se notar, a umidade do substrato influenciou significativamente a produção de PG quando o fungo foi cultivado a 50°C. Este resultado corrobora os dados obtidos por Berovic e Ostroversnic (1997) sobre a produção desta enzima por *Aspergillus niger*. Segundo estes autores, a produção foi

significativamente dependente dos valores de umidade analisados. A biossíntese da enzima foi maior quando a umidade foi de 38%. Já em níveis mais elevados, a produção decresceu significativamente. Resultados similares foram encontrados por Castilho *et al.* (2000) no estudo da produção de pectinases por este microrganismo, no qual a melhor produção de PG ocorreu no nível de umidade de 40%. Em 25% e 70% de umidade, a atividade caiu significativamente.

Estes níveis de umidade são bem menores que aquele que proporcionou a maior produção de PG e PL pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, que foi de 70%. Por outro lado, resultado similar foi encontrado por Jecu (2000), que estudou a influência deste fator na produção de endoglucanase por *Aspergillus niger*. A maior atividade desta enzima foi proporcionada quando a umidade do substrato foi de 74%, sendo que a 80% a produção decresceu.

De acordo com Gervais e Molin (2002), a quantidade de água disponível é um fator essencial ao metabolismo de fungos na fermentação em estado sólido, principalmente pelas seguintes razões: se a quantidade de água for insuficiente e não permitir uma boa difusão de solutos e gases, o metabolismo celular diminui ou cessa pela falta de substrato ou pela alta concentração de metabólitos inibidores; se a quantidade de água intra ou extracelular não permitir a manutenção das propriedades funcionais de algumas enzimas, a inatividade destas cria um desequilíbrio na cadeia metabólica celular e, se houver modificação na membrana plasmática, todas as propriedades de permeabilidade e transporte através da membrana serão afetadas. Por outro lado, elevados níveis de umidade afetam a porosidade do substrato e impedem a penetração de oxigênio no mesmo, interferindo assim no crescimento microbiano aeróbio (PANDEY, 2002).

Portanto, pode-se concluir que em relação à influência dos fatores físico-químicos estudados na produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, as condições que apresentaram-se mais

eficientes na produção da enzima foram: pH inicial do substrato de 5,0, umidade inicial de 70% e temperatura de incubação de 50°C.

4.2- Pectina liase

Os resultados gerais dos tratamentos aplicados para a produção de pectina liase estão apresentados na tabela 24.

Tabela 24: Produção média de pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em FES no experimento fatorial 3x2x2, na combinação de diferentes fatores físico-químicos.

Tratamento	Média (U/g)
pH 5,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 50° C	1659,1
pH 5,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 55° C	382,9
pH 5,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 50° C	944,4
pH 5,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 55° C	229,7
pH 5,5 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 50° C	385,2
pH 5,5 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 55° C	127,7
pH 5,5 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 50° C	127,7
pH 5,5 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 55° C	459,47
pH 6,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 50° C	204,3
pH 6,0 – Umidade 70% - Temperatura de incubação 55° C	0
pH 6,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 50° C	76,7
pH 6,0 – Umidade 80% - Temperatura de incubação 55° C	0

A partir dos resultados dos diferentes tratamentos aplicados, foi feita a análise de variância, apresentada na tabela 25. A média geral do ensaio foi 383,1 U/g, com desvio padrão de 293,4 U/g e coeficiente de variação de 76,6 U/g.

Tabela 25: Análise de variância da produção de pectina liase em meio composto por bagaço de cana e de laranja (30/70%), em diferentes condições de pH, umidade e temperatura de incubação.

Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	F
pH (A)	2	3441115,6	1720557,8	19,9 **
Umidade (B)	1	212152,4	212152,4	2,5 NS
Temperatura (C)	1	1207361,4	1207361,4	14,0 **
A x B	2	369090,0	184545,0	2,1 NS
A x C	2	1828829,5	914414,8	10,6 **
B x C	1	408534,0	408534,0	4,7 *
A x B x C	2	100537,3	50268,7	0,6 NS
(Tratamentos)	11	7567620,3	687965,5	
Resíduo	24	2065550,2	86064,6	

NS= não significativo; *= significativo ao nível de 5%; **= significativo ao nível de 1%.

Pode-se observar, pelos resultados da análise de variância, que os fatores pH e temperatura de incubação exerceram efeito significativo sobre a produção de pectina liase ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que o fator umidade não foi significativo.

A interação entre pH e umidade do substrato também não exerceu efeito significativo. Já entre pH e temperatura de incubação foi significativa ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que entre umidade e temperatura de incubação foi significativa ao nível de 5%. Pode ser observado também que a interação entre os três fatores não foi significativa. Com a aplicação do teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase em relação aos diferentes valores de pH inicial do substrato, pode-se notar que a maior produção da enzima ocorreu quando utilizou-se o pH natural (804,0 U/g). Este resultado é apresentado na tabela 26.

Com relação à umidade inicial do substrato, a que proporcionou maior atividade da enzima foi 70% (459,9 U/g), enquanto que a 80% de umidade este valor foi de 306,3 U/g (Tab. 26).

Quanto às temperaturas de incubação analisadas, a que proporcionou maior eficiência na produção de PL foi a de 50°C, na qual houve uma produção média de 566,2 U/g da enzima, enquanto que a 55°C este valor foi de 200,0 U/g (Tab. 26).



Tabela 26: Teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase nos diferentes fatores físico-químicos estudados.

Fator	Média (U/g)
pH inicial do substrato	
5,0	804,0 A
5,5	275,0 B
6,0	70,2 B
Umidade inicial do substrato	
70%	459,9 A
80%	306,3 A
Temperatura de incubação	
50°C	566,2 A
55°C	200,0 B

Com o desdobramento do fator temperatura de incubação dentro do fator pH inicial do substrato, observou-se que a temperatura influenciou significativamente a produção de pectina liase, ao nível de 1% de probabilidade apenas no valor de pH 5,0. Já quando o pH do substrato foi 5,5 e 6,0, a temperatura não influenciou significativamente a produção da enzima (Tab. 27).

Tabela 27: Desdobramento do fator temperatura de incubação dentro do fator pH.

Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M.	F
Temperatura em pH 5,0	1	2972861,7	2972861,7	34,6 **
Temperatura em pH 5,5	1	4136,7	4136,7	0,04 NS
Temperatura em pH 6,0	1	59192,7	59192,7	0,7 NS
	(3)	(3036191,0)		

NS= não significativo; **= significativo ao nível de 1%.

Através do teste de Tukey aplicado para as médias de produção da enzima produzida em substrato com pH 5,0 nas diferentes temperaturas, pode-se observar que a temperatura de 50°C proporcionou uma atividade bem mais elevada quando comparada com a obtida a 55°C (1301,8 U/g e 306,3 U/g, respectivamente). Estes resultados são apresentados na tabela 28.

Tabela 28: Teste de Tukey para as médias de produção de pectina liase em cada temperatura de incubação do fungo.

pH	Temperatura	Média (U/g)
5,0	50°C	1301,8 A
	55°C	306,3 B
5,5	55°C	293,6 A
	50°C	256,4 A
6,0	50°C	140,5 A
	55°C	0 B

Assim, pode-se concluir que, dentre os fatores pH inicial do substrato e temperatura de incubação, as condições mais adequadas para a produção de pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* são, respectivamente, pH 5,0 e temperatura de 50°C, sendo as mesmas condições encontradas para a produção de poligalacturonase por este microrganismo.

Através do desdobramento do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação, observa-se que a 50°C houve diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, enquanto que a 55°C não houve diferença significativa (Tab. 29).

Tabela 29: Desdobramento do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação.

Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M.	F
Umidade em temperatura de 50°C	1	604743,4	604743,4	7,0 *
Umidade em temperatura de 55°C	1	15943,0	15943,0	0,2 ^{NS}
	(2)	(620686,4)		

NS= não significativo; *= significativo ao nível de 5%.

Com a aplicação do teste de Tukey, observa-se que a 50°C a umidade que proporcionou maior média de atividade da pectina liase foi 70% (749,5 U/g). Com 80% de umidade inicial do substrato, este valor foi de 382,9 U/g (Tab. 30).

Tabela 30: Teste de Tukey para as médias do fator umidade dentro do fator temperatura de incubação.

Temperatura	Umidade	Média (U/g)
50°C	70%	749,5 A
	80%	382,9 B
55°C	80%	229,7 A
	70%	170,2 A

Em relação à influência dos fatores físico-químicos estudados na produção de pectina liase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, as condições mais adequadas para a produção da enzima neste experimento foram: pH inicial do substrato de 5,0, umidade inicial de 70% e temperatura de incubação de 50°C, sendo igual aos resultados encontrados na produção de poligalacturonase por este microrganismo, nas condições estudadas.

IX- CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PECTINASES E PERFIL ENZIMÁTICO PRODUZIDO PELO FUNGO *Thermoascus aurantiacus*

1- INTRODUÇÃO

As pesquisas de produção de enzimas por microrganismos termofílicos têm crescido significativamente nos últimos anos (HOLST *et al.*, 1997; VIEILLE e ZEIKUS, 2001). A atenção dos pesquisadores para estes microrganismos deve-se principalmente às características intrínsecas de suas enzimas, tais como a alta estabilidade à temperatura, ao pH e à agentes químicos (BRUINS *et al.*, 2001).

As enzimas dos termofílicos são geralmente mais termoestáveis, quando comparadas com as dos mesofílicos e podem ser usadas em diversos processos industriais, podendo substituir enzimas mesofílicas ou agentes químicos. Sob o ponto de vista industrial, várias são as razões para a seleção e estudo de enzimas produzidas por microrganismos termofílicos, tais como (BRUINS *et al.*, 2001; LEA *et al.*, 1998):

- Apresentam alta estabilidade à temperatura e são geralmente mais resistentes à agentes detergentes e à enzimas proteolíticas.

- Como o processo ocorre a altas temperaturas, o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos é reduzido.

- Em processos com substratos fluidos, em altas temperaturas a viscosidade do substrato é reduzida, facilitando o seu bombeamento, filtração e centrifugação, e permitindo o uso de menor quantidade de água, o que, conseqüentemente, baixa os custos do processo.

- A transferência de calor e de massa é mais eficiente e mais substrato pode ser dissolvido em altas temperaturas, proporcionando maior rendimento e menor tempo necessário para os processos.

Além desses fatores, a boa estabilidade que estas enzimas geralmente apresentam em valores mais extremos de pH, permite que as mesmas sejam usadas no processamento de vários tipos de sucos e vegetais.

A caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheça suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos.

O conhecimento do perfil enzimático, ou seja, do conjunto de enzimas que um microrganismo produz em determinado substrato, permite avaliar as potencialidades do preparado enzimático obtido. A presença de um conjunto específico de enzimas pode ser desejável em alguns processos, por exemplo, no processamento de alguns tipos de sucos, mas, por outro lado, alguns processos requerem a presença de apenas um grupo enzimático específico. Dessa forma, é importante conhecer quais enzimas são produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, nas condições ótimas de produção das pectinases estudadas no presente trabalho.



2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o pH e a temperatura ótimos para a atividade das enzimas poligalacturonase e pectina liase produzidas pelo *Thermoascus aurantiacus*;
- Avaliar a estabilidade destas enzimas em diferentes valores de pH e temperatura das enzimas;
- Estudar a produção de outras enzimas hidrolíticas (celulases, hemicelulases, ligninases, amilases e endo-poligalacturonase) pelo fungo, durante o processo fermentativo.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Microrganismo

O microrganismo, o meio de manutenção, o meio para a fermentação em estado sólido estão descritos, respectivamente, nos itens 3.1, 3.2.1 e 3.2.2 do capítulo I. Os recipientes de fermentação utilizados nestes experimento estão descritos no item 3.3 do capítulo II.

3.2- Inóculo, suplementação de nutrientes e hidratação

O substrato (citado no item 3.2.2 do capítulo I) foi inoculado com 5 mL de suspensão de massa micelial e hidratado com 7 mL de solução nutriente composta por 0,1% de NH_4NO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (umidade de 70%), conforme as condições definidas nos ensaios anteriores (capítulo III), como as mais adequadas para a produção das enzimas.

As enzimas obtidas em fermentações sob tais condições foram comparadas, com relação às suas características físico-químicas, com aquelas obtidas nas condições iniciais, ou seja, inoculação do substrato com 10 ml de suspensão micelial e 10 ml de solução nutriente composta por 0,1% de NH_4NO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (75% de umidade).

3.3- Caracterização físico-química das pectinases

A caracterização das enzimas foi realizada no início dos ensaios, visto que se pretendeu trabalhar nas condições ótimas de atividade enzimática nos ensaios de produção. Ao final dos ensaios, esses testes foram repetidos com o intuito de avaliar se houve variação no tipo de enzima produzida, após a otimização das condições de produção.

3.3.1- Determinação do pH e temperatura ótimos

O comportamento das atividades das enzimas em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em



tampões acetato (pH 3,0 a 5,5), citrato-fosfato (pH 5,5 a 7,0), tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5).

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 a 80°C, durante 10 minutos, em pH determinado como ótimo.

3.3.2- Determinação da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH

As soluções enzimáticas foram mantidas por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 10 a 90°C. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperaturas ótimos. Foi também avaliada a estabilidade das enzimas na temperatura de 60°C, em períodos de 1 a 8 horas.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-as em tampões com pH variando de 2,5 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.

3.4- Estudo do perfil enzimático

Uma vez determinadas as condições ideais para a produção de exo-poligalacturonase e pectina liase, foram determinadas as atividades de outras enzimas despolimerizantes na solução enzimática bruta obtida, tais como: xilanase, avicelase, carboximetilcelulase, α -amilase, glucoamilase, lacase, manganês-peroxidase, lignina peroxidase e endo-poligalacturonase.

3.5- Medida da atividade enzimática

3.5.1- Atividade de Poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi medida conforme descrito no item 3.5.1 do capítulo I. 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.

Foi também utilizado o método viscosimétrico para avaliação de 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 fosse de 1,5%. As misturas de reação foram incubadas por dez minutos, a 70°C. 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 mistura de enzima inativada, tampão e pectina em igual proporção à da amostra. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% a viscosidade da solução nas condições de ensaio.

3.5.2- Atividade de Pectina liase (PL)

A atividade de PL foi medida conforme descrito no item 3.5.2 do capítulo I. Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5550.

3.5.3- Atividade de Xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada numa mistura contendo 0,9 ml substrato (solução 0,5% de xilana Birchwood-Sigma em tampão acetato 0,1 M e pH 5,0) e 0,1 ml da solução enzimática bruta, incubada por 10 minutos a 60°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do DNS. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de xilose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de xilose.



3.5.4- Atividade de Avicelase e CMCase

A atividade da avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao da xilanase, exceto que o substrato utilizado foi solução de avicel (Sigma Co) a 0,5% e a substância redutora quantificada a partir de curva padrão de glicose. O mesmo procedimento foi utilizado para detectar a atividade da CMCase, exceto que o substrato utilizado foi solução de CMC (carboximetilcelulose Sigma Co) a 0,5%. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de glicose.

3.5.5- Atividade de Amilase

A atividade de α -amilase (ou dextrinizante) foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de ligação amido-iodo de uma solução de amido. A mistura de reação foi composta por 0,1ml de solução enzimática bruta e 1,0ml de solução de amido a 0,5% em tampão acetado 0,1 M em pH 5,0. Após 10 min. de reação a 60°C, uma amostra de 0,5 ml foi removida e adicionada a 4,8 ml de HCl a 0,1 M e 0,15 ml de reagente de iodo (0,05% de I_2 + 0,1% KI). Após agitação lenta por 5 min. realizou-se leitura a 620 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 min. nas condições de ensaio.

3.5.6- Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi determinada a 60°C usando 2,2'-azino-bis-etilbenthiiazolina (ABTS) em 1 ml de uma mistura contendo 0,1 ml de acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 0,8 ml de solução de ABTS a 0,3% (p/v) e 0,1 ml da solução de enzima bruta. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado de $3,6 \times 10^4/\text{mol}/\text{cm}$.



3.5.7- Atividade de Manganês-peroxidase

A atividade de Manganês-peroxidase (Mn-P) na solução enzimática bruta foi determinada a 60°C numa mistura de reação composta de 0,8 ml de tampão lactato de sódio a 0,05M (pH 4,5), 0,1 ml de solução de solução de MnSO_4 a 0,4M e 0,1 ml da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 μM) e a absorbância medida a 240 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $8.1 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$.

3.5.8- Atividade de Lignina-peroxidase

A atividade de Lignina-peroxidase (Lip) na solução enzimática bruta foi determinada a 60°C numa mistura de reação composta de 0,8 ml de tampão fitalato ácido de potássio-HCl a 0,05M (pH 3,0), 0,1 ml de solução de solução de álcool veratrílico a 40 mM e 0,1 ml da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$.



4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas

Com relação à influência do pH na atividade da exopoligalacturonase (exo-PG), nota-se que, antes da otimização do processo de produção desta enzima, a atividade foi maior na faixa de pH entre 4,0 e 5,0, atingindo a máxima no pH 4,5. A atividade decresceu até o pH 7,0, sendo que em pH acima deste valor não foi detectada atividade enzimática (Fig. 15).

O perfil de atividade, obtido após a otimização do seu processo de produção, foi bastante semelhante ao obtido no início dos ensaios. Observa-se que, após a otimização, a atividade da exo-PG foi maior na faixa de pH entre 3,5 e 5,0 e decresceu até 6,5. No entanto, atividade máxima ocorreu em pH 5,0. Em pH acima deste valor também não houve atividade desta enzima (Fig. 15). Este resultado é semelhante ao obtido por Zheng e Shetty (2000), que relataram que o pH ótimo da exo-PG produzida por *Lentinus edodes* foi 5,0 e que, em valores maiores que 7,0, esta praticamente não foi detectada.

Já em relação à atividade de pectina liase, o valor do pH ótimo para a sua atividade foi bem diferente antes e após a otimização do seu processo de produção. Antes da otimização, a atividade foi maior na faixa de pH entre 8,0 e 11,0, atingindo a atividade máxima em 10,5-11,0. Após, a atividade de pectina liase foi maior entre os valores de 8,5 e 9,5, atingindo o pico no pH 9,5. Na faixa entre 3,0 e 6,5 também não foi detectada atividade desta enzima (Fig. 15).

Este resultado corrobora os dados obtidos por Said *et al.* (1991), os quais indicaram que a pectina liase produzida por *Penicillium frequentans* atua em valores de pH alcalinos. Entretanto, esse valor de pH ótimo (10,5-11,0) é superior àquele determinado para outras PL fúngicas, que normalmente ficam entre 7,5-8,5 (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1995).



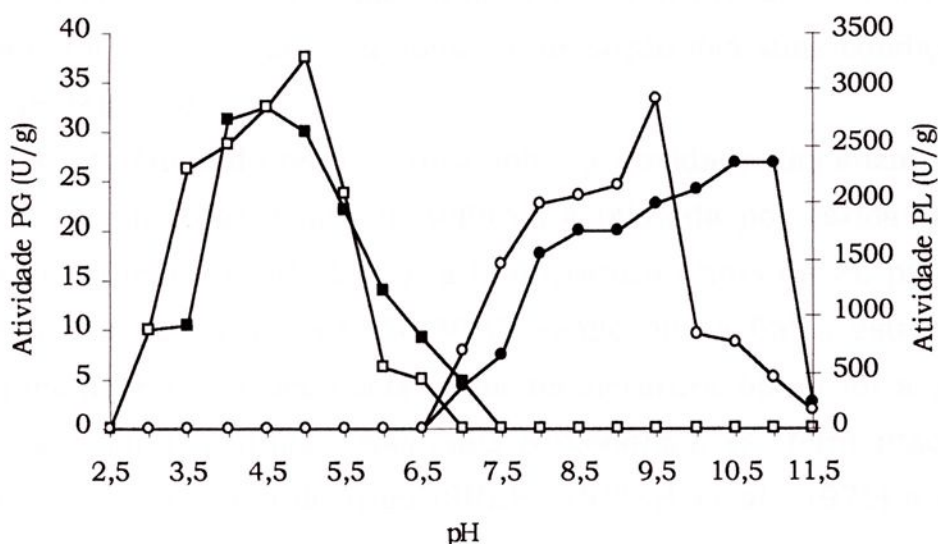


Figura 15: Efeito do pH sobre a atividade das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* em FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja. Tampões: acetato 2,5-5,5; citrato 5,5-7,0; tris-HCl 7,0-8,5; glicina 8,5-11,5. -■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -○- PL após otimização.

4.2- Determinação da temperatura ótima para a atividade das enzimas

A temperatura ótima para a atividade e a termoestabilidade da exo-PG também mostraram-se diferentes após a otimização das condições de produção. Nos primeiros ensaios, a atividade de exo-PG aumentou com a elevação da temperatura até 65°C, na qual atingiu o maior valor. Em temperaturas mais elevadas, a atividade desta enzima decresceu, porém ainda manteve 47% de sua atividade máxima a 75°C (Fig. 16).

Com a otimização do processo de produção desta enzima, a sua atividade aumentou até a temperatura de 70°C, na qual ocorreu o pico de atividade. Em valores mais elevados de temperatura, a atividade decresceu, porém ainda manteve cerca de 59% de sua atividade máxima a 75°C e 51% a 80°C (Fig. 16).

Já para a pectina liase (PL), a temperatura ótima para a sua atividade foi de 65°C, antes e após a otimização das suas condições de produção (Fig. 16).

A influência da temperatura sobre a atividade das enzimas exo-PG e PL de microrganismos mesofílicos é relatada por vários autores. Segundo Brumano *et al.* (1993), a temperatura ótima da PL produzida por *Penicillium griseoroseum* foi 50°C, sendo que a 65°C, esta enzima praticamente não foi detectada. Esta temperatura ótima foi a mesma encontrada para o fungo *Aspergillus carbonarius*, em fermentação em estado sólido de farelo de trigo (SREEKANTIAH *et al.*, 1975) e para o fungo *Lentinus edodes*, crescendo em polpa de morango, no mesmo processo fermentativo (ZHENG e SHETTY, 2000). Entretanto, poucas informações existem a respeito de pectinases de fungos termofílicos.

Dados sobre exo-PG de *Thermomyces lanuginosus*, apresentados por Sathish Kumar e Palanivelu (1998), indicam temperatura de 70°C para a atividade ótima da enzima, embora o mesmo fungo também tenha produzido outra poligalacturonase, com atividade ótima a 60°C.



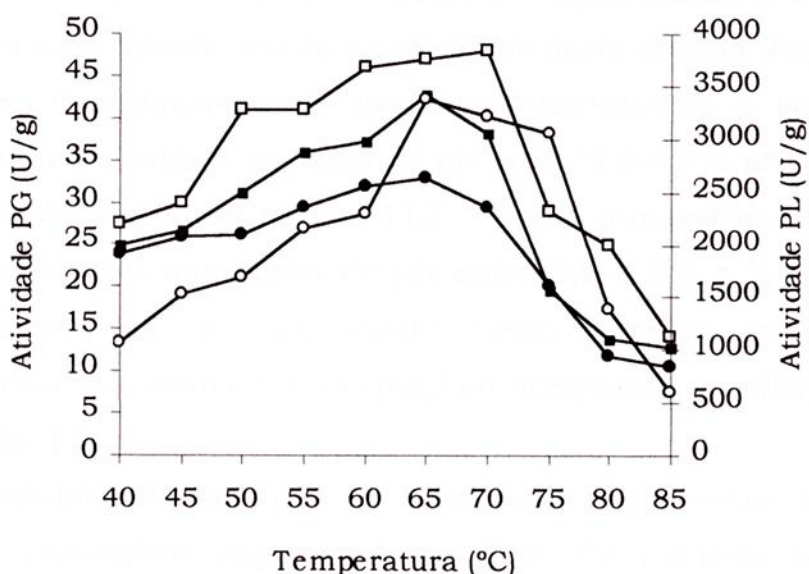


Figura 16: Efeito da temperatura sobre a atividade das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja. -■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -○- PL após otimização. Tempo de pré-incubação: 10 minutos para PG e 30 minutos para PL.

4.3- Determinação da estabilidade das enzimas frente à variação de pH e temperatura

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da exo-PG e PL, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente à variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.

Antes da otimização do processo fermentativo, a exopoligalacturonase mostrou-se estável na faixa entre 3,0 e 8,0, apresentando 100% de sua atividade original na faixa de pH de 7,5-8,0. Porém, preservou mais de 60% de sua atividade original em pH 11,5, após a incubação da enzima em tampão sem substrato, por 24 horas. Após a otimização, esta enzima mostrou-se estável na faixa de pH entre 7,5 e 8,5, na qual manteve 100% de sua atividade original e também preservou cerca de 60% de sua atividade original em pH 11,5. Nos

valores de pH entre 5,5 e 7,0, nos quais o tampão utilizado foi o citrato-fosfato, notou-se grande queda na atividade desta enzima (Fig. 17).

Antes da otimização do processo fermentativo, a pectina liase mostrou-se mais estável na faixa de pH entre 3,0-4,0 e preservou 55% de sua atividade original em pH 11,5. Após a otimização, esta enzima mostrou-se estável nas faixas de pH entre 3,0 e 5,0 e 7,5 e 9,0. Nos valores entre 5,5 e 7,0, assim como ocorreu para a exopoligalacturonase, houve um decréscimo acentuado na atividade desta enzima (Fig. 17).

A estabilidade ao pH de pectinases produzidas pelo fungo mesofílico *Aspergillus niger* CH4 em FES, foi relatada por Acuña-Argüelles *et al.* (1995). A exo-PG produzida por esta linhagem mostrou ser estável na faixa de pH de 4,0 a 5,0, enquanto que a PL mostrou-se mais estável na faixa de pH entre 2,5 e 8,0, com baixa estabilidade em valores superiores.

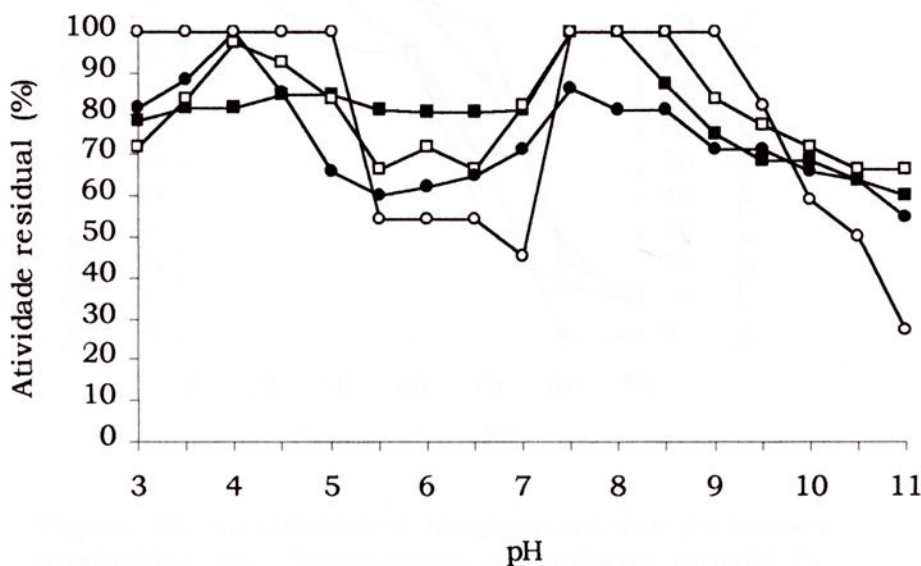


Figura 17: Estabilidade das pectinases produzidas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de FES, frente às variações de pH, em ausência de substrato. -■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -○- PL após otimização. Tempo de pré-incubação: 24 horas.

Com relação à estabilidade em várias temperaturas, em ausência de substrato, nota-se que a exo-PG, no início dos experimentos, manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora na temperatura de 50°C e 80% quando pré-incubada a 60°C. A atividade decresceu acentuadamente após 65°C, sendo que a 80°C esta já não foi mais detectada. Após a otimização do processo para sua produção, esta enzima manteve cerca de 85% da atividade original quando exposta nas temperaturas de 50°C e 60°C (Fig.18).

No início dos ensaios, a pectina liase manteve 100% da sua atividade original após pré-incubação a 60°C e 91% na temperatura de 70°C. Quando pré-incubada a 80°C, houve retenção de 22% de atividade e a 90°C, a atividade residual ainda foi de 13%. Este perfil foi bastante semelhante após a otimização do processo fermentativo (Fig. 18).

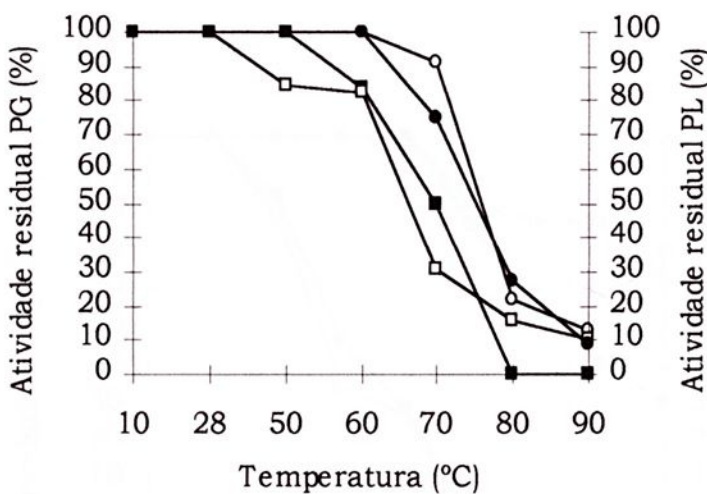


Figura 18: Estabilidade à temperatura das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES por 1 hora, em diferentes temperaturas. -■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -○- PL após otimização.

Como as enzimas apresentaram-se termoestáveis, foi realizado um teste para se determinar quanto tempo estas se mantinham estáveis a 60°C, em ausência de substrato.

A exo-poligalacturonase manteve 100% de sua atividade após 1 hora e 80% após 2 horas. Após 4 horas de exposição a esta temperatura, a enzima reteve 27,5 % da atividade original e após 5 horas, já não foi detectada atividade enzimática. Após a otimização, este perfil foi bastante semelhante (Fig. 19).

A pectina liase manteve 100% de sua atividade a 60°C durante 4 horas. Em temperaturas mais elevadas, a atividade diminuiu, porém ainda houve retenção de 63% da atividade original, após 8 horas de exposição à temperatura de 60°C. Na caracterização posterior à otimização, esta enzima apresentou estabilidade à temperatura por mais tempo. Após 7 horas de incubação a 60°C, manteve cerca de 80% e, após 8 horas, cerca de 63% da atividade original (Fig. 19).

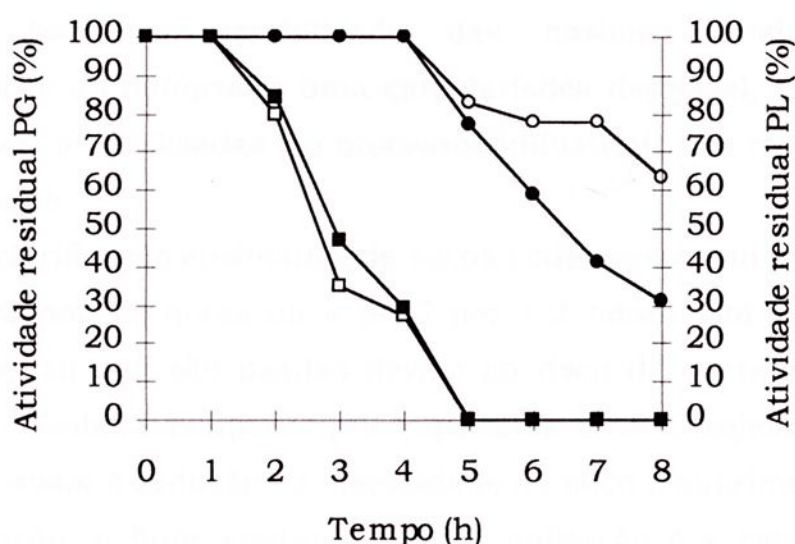


Figura 19: Estabilidade das pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES quando expostas a 60°C, por diferentes períodos. -■- PG antes da otimização; -□- PG após otimização; -●- PL antes da otimização; -○- PL após otimização.

A estabilidade à temperatura de pectinases produzidas por fungos mesofílicos tem sido relatada. Zheng e Shetty (2000) relataram que a exo-poligalacturonase produzida por *Lentinus edodes* mostrou-se estável até 50°C e, quando pré-incubada a 60°C durante 20 minutos, manteve cerca de 40% da atividade original.

A estabilidade à temperatura de pectinases produzidas pelo mesofílico *Aspergillus niger* CH4 em FES, foi relatada por Acuña-Argüelles *et al.* (1995). Estas enzimas mostraram-se estáveis até a temperatura de 50°C, porém quando pré-incubadas em temperaturas superiores, durante 30 minutos, a atividade das enzimas decresceu, sendo que a 70°C praticamente não foi detectada atividade enzimática.

Esta termoestabilidade foi bem menor que aquela apresentada pelas enzimas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* em nossos experimentos, visto que as primeiras foram totalmente desnaturadas quando expostas à temperatura de 70°C por 30 minutos. As pectinases de outras linhagens de *Aspergillus niger* também têm sido descritas como sendo susceptíveis à desnaturação em temperaturas acima de 50°C (BAILEY, 1990).

A boa termoestabilidade das enzimas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* é uma característica desejável, uma vez que estas podem ser utilizadas em processos industriais que requerem altas temperaturas.

A clarificação enzimática de sucos pode ocorrer em temperaturas entre 15°C por 12 horas ou a 54°C por 1-2 horas. Em temperaturas intermediárias não são usadas devido ao risco de contaminação com leveduras. Embora temperaturas superiores a 54°C sejam desejáveis, visto que levam à redução da viscosidade do suco e suprime a etapa de pasteurização, o fator limitante de sua aplicação é a estabilidade do preparado enzimático usado, que freqüentemente não excede 50°C (LEA, 1998). Portanto, enzimas termoestáveis e com temperaturas ótimas de atuação elevadas são importantes para suprir essa necessidade da indústria.

Deve ser destacado ainda que a ampla faixa de pH na qual as pectinases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* mantiveram-se estáveis, além da faixa de pH de atividade não ser muito estreita (4,0-5,5 para exo-PG e 8,0-11,0 para PL), confere às mesmas características que permitem seu uso em diferentes tipos de sucos (ácidos a neutros).

Os poucos relatos na literatura sobre a produção de pectinases termoestáveis por fungos termofílicos acrescentam importância aos dados obtidos nesse trabalho.

4.4- Estudo do perfil enzimático

Uma vez determinadas as condições ótimas para a produção das enzimas exo-poligalacturonase e pectina liase, foram determinadas as atividades de outras enzimas despolimerizantes na solução enzimática bruta obtida. As enzimas testadas foram as seguintes: xilanase, carboximetilcelulase, avicelase, lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, lacase, α -amilase e endo-poligalacturonase.

Estas foram testadas nos tempos de maior produção das enzimas exo-poligalacturonase e pectina liase (4 e 10 dias, respectivamente), no substrato composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja. Os resultados estão apresentados na tabela 31.



Tabela 31: Perfil enzimático produzido pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em meio composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja.

Enzima	Atividade (U/g)	
	Tempo de fermentação	
	4 dias	10 dias
Xilanase	416,7	1288,8
Carboximetilcelulase	2000,0	6064,3
Avicelase	0	46,1
Lignina-peroxidase	2769,0	1371,2
Manganês-peroxidase	2354,0	2619,0
Lacase	0	0
α -amilase	1,8	25,6
Endo-poligalacturonase	3,6	1,4

O fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou alta produção de xilanase nas condições estudadas. Após 4 dias de fermentação a atividade foi de 416,7 U/g e, após 10 dias, este valor foi de 1288,8 U/g. Esta produção é superior à encontrada em alguns relatos na literatura sobre a produção desta enzima por diferentes linhagens deste fungo. Grajek (1987) relatou a produção de 96,7 U/g de xilanase por uma linhagem de *Thermoascus aurantiacus*, cultivado em substrato composto por polpa de beterraba. Alam *et al.* (1994) obtiveram 843,0 U/g desta enzima, produzida pela linhagem *Thermoascus aurantiacus* BJT 190, cultivada em farelo de trigo.

A produção também foi superior à relatada por outros fungos termofílicos. Jain (1995) estudou a produção de xilanase pelo fungo *Melanocarpus albomyces* II-68 em fermentação em estado sólido de

diversos resíduos agro-industriais. A atividade máxima relatada foi de 1084,0 U/g, obtida quando o fungo foi cultivado em farelo de arroz.

Por outro lado, a produção de xilanase obtida em nossos experimentos é inferior à relatada por Kalogeris *et al* (1998), utilizando a linhagem *Thermoascus aurantiacus* IMI 216529 na fermentação de diferentes resíduos agro-industriais. A produção máxima obtida foi de 6193,0 U/g, em meio composto por farelo de trigo, suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.

O fungo também apresentou alta produção de carboximetilcelulase, nas condições estudadas. Em 4 dias de fermentação, a produção foi de 2000 U/g e, após 10 dias, este valor foi de 6064,3 U/g (equivalente a 758 U/ml). Esta produção é muito superior à relatada por Bahkali (1995), que obteve cerca de 25,0 U/ml desta enzima, produzida por *Verticillium tricorpus*. Com relação à produção de avicelase, a atividade obtida em nossos experimentos (46,1 U/g, equivalente a 5,76 U/ml) é inferior à relatada pelo mesmo autor, que obteve cerca de 25,0 U/ml desta enzima pelo fungo *Verticillium tricorpus*.

Quanto à produção de ligninases, o fungo apresentou atividade de lignina-peroxidase e manganês-peroxidase e não foi detectada atividade de lacase, nas condições estudadas. A atividade máxima de manganês-peroxidase foi de 2619,0 U/g (equivalente a 346,0 U/ml), após 10 dias de fermentação. Segundo Nüske *et al.* (2002), a produção de manganês-peroxidase por *Nematoloma frowardii* foi de 1,5 U/ml, após 11 dias de fermentação em lascas de madeira como substrato. A produção desta enzima pelo fungo *Thermosculus aurantiacus* também é muito superior à relatada para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, que produziu 1,3 U/ml desta enzima em fermentação de farelo de trigo (FUJIAN *et al.*, 2001).

Com relação à lignina-peroxidase, a produção máxima foi de 2769 U/g (327 U/ml), após 10 dias, muito superior à relatada por

Fujian *et al.* (2001), que obtiveram produção de 2,7 U/ml desta enzima por *Phanerochaete chrysosporium*.

A atividade máxima de α -amilase foi obtida após 10 dias de fermentação (25,6 U/g). Esta produção é inferior à relatada por Rabalho (2002), que obteve 40,8 U/g desta enzima pela linhagem *Mucor* sp A13-36 em fermentação submersa de meio nutriente com resíduo de mandioca após 120 horas. No entanto, o fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou significativa produção desta enzima nas condições estudadas, principalmente levando-se em consideração o fato de que o substrato utilizado, composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja, não contém nenhuma fonte rica em amido na sua composição. Isto sugere a produção de amilase constitutiva, uma vez que não há indutor no meio para a sua produção.

A produção máxima de endo-poligalacturonase (endo-PG) foi de 3,6 U/g (equivalente a 0,45 U/ml) e ocorreu no tempo de maior produção de exo-poligalacturonase (4 dias). No entanto, esta produção é inferior àquela obtida por outras linhagens microbianas relatadas na literatura. Soares *et al.* (2001) obtiveram cerca de 2,0 U/ml desta enzima, produzida por *Bacillus* sp, através de fermentação em estado sólido de farelo de trigo. Teixeira *et al.* (2000) relataram a produção desta enzimas por *Aspergillus japonicus*, em meio contendo diferentes fontes de carbono. A produção máxima da endo-PG foi de 0,59 U/ml, em meio contendo pectina a 1,0% e glicerol a 0,2%. Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) relataram a produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus* sp ATHUM-3482. A atividade máxima obtida foi de 17,0 U/ml, quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo pectina de citrus como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte de nitrogênio.

A produção de pectinases, xilanase, carboximetilcelulase, α -amilase e ligninases apresentada pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* no presente trabalho demonstra o alto potencial desse fungo para a produção de diversas enzimas, as quais podem ser usadas em

diferentes processos industriais. Além disso, diferentes preparados enzimáticos, com grande potencial biotecnológico, podem ser obtidos.

Preparados enzimáticos contendo pectinases, celulasas e hemicelulasas têm sido amplamente utilizados, em diversos processos industriais. Preparações comerciais destas enzimas, geralmente produzidas por *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp são utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas (BHAT, 2000). Na produção de vinhos, uma combinação adequada destas enzimas aumentam a extração do mosto, diminuem a viscosidade e ainda melhoram a estabilidade do vinho produzido. Recentemente, preparações enzimáticas específicas para melhorar a extração do suco de uva e a qualidade final do produto têm sido obtidas. De fato, a utilização de enzimas na indústria de vinhos oferece enormes benefícios, no entanto, novas enzimas com propriedades distintas são requeridas para trazer futuros benefícios, tanto para os produtores quanto para os consumidores (BHAT, 2000).

A presença de α -amilase nestes preparados também pode ser importante no processamento de frutas e vegetais que contém amido na sua composição. Um exemplo para essa aplicação é a atuação de preparados enzimáticos contendo amilases em suco de cenoura e de maçã, que são materiais que apresenta quantidades significativas de amido na sua composição. O amido presente no suco, após a sua extração, pode causar a formação de precipitados e aumentar a viscosidade do produto, alterando assim a sua consistência e aparência. A aplicação de preparados enzimáticos contendo amilases previne este problema, uma vez que tais enzimas degradam o amido presente (ROMBOUTS e PILNIK, 1978).

Preparações enzimáticas contendo ligninases, xilanases e pectinases também podem apresentar um amplo potencial biotecnológico. Estas podem atuar, por exemplo, no branqueamento da polpa “kraft” de eucalipto, durante a produção de papel. As ligninases ajudam na quebra das moléculas de lignina, ajudando a liberação das



fibras de celulose. As pectinases e xilanases presentes também exercem esse papel, uma vez que a quebra dos materiais pécnicos e hemicelulolíticos ajuda na liberação das fibras de celulose. Estas enzimas, principalmente as xilanases, atualmente têm sido amplamente utilizadas para este propósito. A utilização de enzimas nesse processo substitui a utilização de compostos químicos utilizados para a liberação das fibras de celulose, que são altamente poluentes (VIKARI *et al.*, 1994) e ainda diminui os custos com energia requerida no processo (BHAT, 2000).

Portanto, a produção destas enzimas, além das pectinases, pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* relatada no presente trabalho, mostra o grande potencial biotecnológico deste fungo, uma vez que este produz altas quantidades de várias enzimas com grande potencial de uso industrial.



X- CONCLUSÕES

1- O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* apresentou boa produção das enzimas poligalacturonase e pectina liase nos diferentes resíduos agro-industriais testados. Analisando-se em conjunto a produção nos diferentes substratos estudados, o que proporcionou melhor produção de ambas as enzimas foi o composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja.

2- O tempo de fermentação que proporcionou a maior produção de poligalacturonase foi de 4 dias de fermentação, em frascos Erlenmeyer e com a adição de solução nutriente composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%. Para a pectina liase, a produção máxima ocorreu em 10 dias de fermentação, em embalagem de polipropileno e com a adição da mesma solução nutriente.

3- Com relação aos fatores físico-químicos estudados, as condições que proporcionaram maior produção de ambas as enzimas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* foram: pH inicial do substrato 5,0; umidade inicial do substrato em 70% e temperatura de incubação do fungo de 50°C.

4- A temperatura ótima da poligalacturonase foi de 65°C antes da otimização das condições de produção e, após, foi de 70°C. A da pectina liase foi de 65°C, e não se alterou após a otimização das condições de produção. O pH ótimo da poligalacturonase antes da otimização foi 4,5 e, após, foi 5,0. O da pectina liase, antes da otimização, ficou na faixa de 10,5-11,0 e, após, apresentou pH ótimo 9,0.



5- As pectinases produzidas apresentaram boa estabilidade ao pH e à temperatura. A poligalacturonase mostrou maior estabilidade nas faixas de pH entre 7,5-8,0 e 7,5-8,5 antes e após a otimização, respectivamente. Já a pectina liase, antes da otimização mostrou-se mais estável na faixa de pH entre 3,0-4,0 e, após, foi estável nas faixas de pH entre 3,0 e 5,0 e 7,5 e 9,0. Com relação à termoestabilidade, a poligalacturonase, antes da otimização das condições de produção, manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora até a temperatura de 50°C e 80%, a 60°C. Após a otimização, esta enzima manteve cerca de 85% da atividade nas temperaturas de 50°C e 60°C. A pectina liase manteve 100% da sua atividade original até 60°C e 91% na temperatura de 70°C, sendo este perfil bastante semelhante após a otimização das condições de produção.

Estas características proporcionam grande possibilidade de aplicação destas enzimas em processos que requerem altas temperaturas e, além disso, permite a aplicação em produtos com diferentes valores de pH.

6- O fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou, além das pectinases, boa produção de outras enzimas hidrolíticas, como xilanase, carboximetilcelulase e ligninases, o que demonstra o grande potencial em se obter complexos enzimáticos deste microrganismo, os quais podem ser utilizados em diferentes processos industriais.



XI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-NASSER, N. H.; HELMI, S. M.; EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, p. 249-255, 1997.

ACUÑA-ARGÜELLES, M. E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 23-28, 1994.

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 and Biotechnology**, v. 43, p. 808-814, 1995.

AGUILAR, G.; TREJO, B. A.; GARCÍA, T. J. M.; HUITRÓN, C. Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 912-917, 1991.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, J. B. Solid substrate fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 28, p. 201-237, 1982.

AIKAT, K.; BHATTACHARYYA, B. C. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 907-914, 2000.

ALAM, M.; GOMES, I.; MOHLUDDIN, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme Microbial Technology**, v. 16, p. 298-302, 1994.

ALANA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M. D.; DOMINGUEZ, J. B.; ELAMA, M. J.; SERRA, J. L. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1612-1616, 1989.

ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. **Methods Enzymology**, v. 8, p. 628-631, 1966.

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

ANTIER, P.; MINJARES, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 254-260, 1993.

AQUINO, A. C. M. M. Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades glucoamilase e α -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre, 2000.

BAHKALI, A. H. Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 171-174, 1995.

BAILEY, M. J. Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 622-624, 1990.

BANSOD, F. M.; DUTTA-CHOUDHARY, M.; SRIVASAN, M. C.; RELE, M. V. Xylanase activity at high pH from an alkalo-tolerant *Cephalosporium* species. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 965-970, 1993.

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.

BHAT, M. K. Research review paper: Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-104, 1981.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; SERRANO, L., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. **Journal of Food and Science Technology**, v. 31, p. 22-26, 1994.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, p. 137-152, 2000.

BROCK, J. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Biology of microorganisms, Prentice Hall International Inc., New York, 8ª Ed., 1998.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-189, 2001.

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Pectin lyase activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. **Revista de Microbiologia**, v. 24, p. 175-178, 1993.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 6, p. 2-7, 1980.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 181-186, 1999.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, 2000.

DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 249-260, 1997.

DEL BIANCHI, V. L. Produção de enzimas proteolíticas ácidas por fermentação fúngica em meio semi-sólido. Dissertação apresentada à Universidade de Campinas, para obtenção do título de mestre, 1990.

DENISON, S. H. Review: pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 29, p. 61-71, 2000.

DE-PAULA, E. H.; RAMOS, L. P.; AZEVEDO, M. O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 35-41, 1999.

ELISASHVILI, V. I. Byosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes (Review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 29, p. 257-266, 1993.

FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. **Process Biochemistry**, p. 13-17, 1972.

FONSECA, M. J. V.; SAID, S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 32-35, 1994.

FONSECA, M. J. V.; SAID, S. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 174-177, 1995.

FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresource technology**, v. 80, p. 149-151, 2001.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 425-429, 1997.

GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 93-95, 1992.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3637, p. 1-17, 2002.

GRAJEK, W. Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 49-58, 1987.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Food and Science Technology**, v. 27, p. 194-196, 1994.

HESELTINE, C. W. Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p. 517-532, 1972.

HOLST, O.; MANELIUS, A.; KRAHE, M.; MÄRKL, H.; RAVEN, N.; SHARP, R. Thermophiles and fermentation technology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118 A, p. 415-422, 1997.

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.

HUGOUVEIEX-COTTE-PATTAL, N.; CONDEMIN, G.; NASSER, W.; REVERCHON, S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. **Revista de Microbiologia**, v. 50, p. 213-257, 1996.

ISMAIL, A. S. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 645-650, 1996.

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 705-709, 1995.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 155-163, 1998.

KALOGERIS, E.; FOUNTOUKIDES, G.; KEKOS, D. MACRIS, B. J. Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 313-315, 1999.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUHAN, B.; SINGH, K.; DADHICH, K. S.; HOONDAL, G. S. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 803-807, 2001.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial setor: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

LARIOS, G.; GARCIA, J. M.; HUITRON, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 729-734, 1989.

LEA, A. G. H. Enzymes in the production of beverages and fruit juices. In: Tucker, G. A. and Woods, L. F. J. Enzymes in Food Processing, sec. Ed, Backie Academic & Professional, Glasgow, p. 223-247, 1998.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MAHMOOD, A. U.; GREENMAN, J.; SCRAGG, A. H. Orange and potato peel extracts: Analyses and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 130-137, 1998.

MALDONADO, M. C.; NAVARRO, A.; CALLIERI, D. A. S. Production of pectinases by *Aspergillus* sp using differently pretreated lemon peel as the carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 501-504, 1986.

MANONMANI, H. K.; SREEKANTIAH, K. R. Saccharification of sugar-cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 484-488, 1987.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949-954, 2002.

MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Sistema celulolítico de *Aspergillus niger* em substrato sólido de bagaço de cana-de-açúcar tratado. **Coletânea do ITAL**, v. 24, p. 75-89, 1994.

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

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

MULINAMI, V. H.; PATIL, G. N.; RAMALINGAM. α -Amilase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. **Biochemical Education**, v. 28, p. 161-163, 2000.

NÜSKE, J.; SCHEIBNER, K.; DORNBERGER, U.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 556-561, 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. **TIB Technology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

PANDEY, A. Recent developments in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1-4, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000b.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações, v. I, São Paulo: ed. Makron Books, 1996.

RABALHO, A. A. Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca. Dissertação apresentada à Unesp, São José do Rio Preto, para obtenção do título de mestre, 2002.

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. Dissertação apresentada à Universidade de Campinas, para obtenção do título de mestre, 1999.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Process Biochemistry**, p. 9-13, 1978.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Bioconversions*, v. 5, p. 227-282, ed. A. H. Rose. Academic Press, London, 1980.

SAID, S.; FONSECA, M. J. V.; SIÉSSERE, V. Pectinase production by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 7, p. 607-608, 1991.

SAPUNOVA, L. I.; LOBANOK, A. G.; MIKHAILOVA, R. V. Conditions of synthesis of pectinases and proteases by *Aspergillus alliaceus* and production of a complex macerating preparation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 33, p. 257-260, 1997.

SATHISH KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Production and properties of pectinolytic enzymes from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 781-782, 1998.

SATHISH KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 643-646, 1999.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 234-244, 1997.

SINGH, S. A.; PLATTNER, H.; DIEKMANN, H. Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 420-425, 1999a.

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



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

SOARES, M. M. C. N. Isolamento de linhagens microbianas produtoras de pectinases e caracterização das enzimas. Dissertação apresentada à Unesp, Rio Claro, para obtenção do título de mestre, 1999.

SOLEHAH, A.; BALAUMANI, V. T.; DAS, K.; AMIZA, M. A. Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. **Journal of Food and Science Technology**, v. 31, p. 508-510, 1994.

SOLÍS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 36-41, 1993.

SREEKANTIAH, K. R.; JALEEL, S. A.; NARAYANA RAO, D.; RAGHAVENDRA RAO, M. R. Pectinolytic enzymes produced by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 2, p. 173-181, 1975.

SREENATH, H. K.; SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, p. 241-243, 1992.

TAKAO, M.; NAKANIWA, T.; YOSHIKAWA, K.; TERASHITA, T.; SAKAI, T. Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp TS47. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2360-2367, 2000.

TEIXEIRA, M. F. S.; FILHO, J. L. L.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 286-290, 2000.

TOLNER, B.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 423-428, 1997.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 4, p. 524-532, 1982.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Reviews: Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **TIB Technology**, v. 14, p. 183-190, 1996.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 1-43, 2001.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from na idea to the industry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 13, p. 335-350, 1994.

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

YAO, C.; CONWAY, W. C.; SAMS, C. E. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 86, p. 1160-1166, 1996.

