

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**Produção de Poligalacturonase pela Linhagem**  
***Aspergillus niger* Mutante 3T5B8 por Fermentação Semi-Sólida**  
**em Biorreatores de Coluna**

**Gianaína Domingues Giacomini de Menezes**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE PELA LINHAGEM  
*Aspergillus niger* MUTANTE 3T5B8 POR FERMENTAÇÃO  
SEMI-SÓLIDA EM BIORREATORES DE COLUNA**

**GIANAÍNA DOMINGUES GIACOMIN DE MENEZES**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Maria Alice Cruz Lopes de Oliveira**

*e Co-orientação da Professora*  
**Sonia Couri**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Engenharia Química, Área de Concentração Engenharia Ambiental.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2006

664.25  
M543p  
T

Menezes, Gianaína Domingues Giacomini de, 1977-

Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna / Gianaína Domingues Giacomini de Menezes. – 2006.

55 f. : il.

Orientador: Maria Alice Cruz Lopes de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia.

Bibliografia: f. 44-55.

1. Pectinase - Teses. 2. *Aspergillus niger* – Teses. 3. Fermentação - Teses. 4. Biotecnologia – Teses. 5. Engenharia química – Teses. I. Oliveira, Maria Alice Cruz Lopes de, 1956-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Tecnologia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GIANAÍNA DOMINGUES GIACOMIN DE MENEZES

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração Engenharia Ambiental, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Engenharia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

---

Maria Alice Cruz Lopes de Oliveira, D.Sc., (Presidente)

---

Sonia Couri, Ph.D., EMBRAPA

---

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc., DEB/EQ/UFRJ

---

Mônica Caraméz Triches Damaso, D.Sc., EMBRAPA

---

Ricardo Verthein Tavares de Macedo, D.Sc., DTA/UFRRJ

*A Deus pelo olhar atento e cuidadoso em todos os momentos e por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa de minha caminhada com sucesso.*

*Aos meus pais, Sebastião e Iêda, pelo carinho e amor que muito contribuíram na minha formação, por todo incentivo que sempre me deram e pela confiança depositada em todos os meus sonhos.*

*Ao Wanderson pelo companheirismo, amor, apoio e carinho demonstrado em todos os momentos e, principalmente, por sua imensa e incansável ajuda na realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À Maria Alice, orientadora e amiga, pelas sugestões, críticas, apoio e incentivo, mas principalmente, pelos seus ensinamentos e exemplo de uma grande mestre.

À Sonia pela participação ativa na produção desta dissertação e pelas valiosas contribuições, apoio e orientação, imprescindíveis à realização deste trabalho.

Ao professor Maurício Mancini, exemplo de dedicação ao trabalho, pela amizade e pelo incentivo constante ao estudo.

À amiga Aninha pelo carinho, paciência e amizade, mas sobretudo, pelo grande auxílio na realização dos experimentos, ensinando as técnicas microbiológicas fundamentais para a realização deste trabalho.

À Mônica pelo carinho, pelos esclarecimentos e por estar presente em todas as etapas desta pesquisa, lendo criticamente os trabalhos que foram publicados.

Ao Romulo pela amizade, pelas valiosas discussões e pela inestimável colaboração.

Aos técnicos, Wilson (*in memoriam*), Eduardo e Marquinhos, pelo auxílio na análise centesimal do resíduo de maracujá.

Ao Sérgio e à Marisa pela colaboração na definição dos modelos estatísticos empregados.

À Josane pela atenção e por ter gentilmente fornecido a metodologia necessária para a realização da análise do teor de pectina.

À Mara pela valiosa contribuição na revisão do *abstract*.

Ao Edmar que muito contribuiu para que eu pudesse realizar os experimentos na Embrapa.

Aos funcionários da Embrapa, em especial ao Willian, ao “Claudão”, ao “Filé”, à Selma e à Flávia, pela receptividade e pelo apoio técnico.

À Cema, que me acolheu com amor de mãe durante a caminhada na Rural, agradeço pelo carinho, pelos ensinamentos, pela preocupação com o meu bem-estar e pelas orações, tenho certeza que Deus atendeu a cada pedido.

À Jennifer, amiga querida de longa data, pelo carinho e amizade sincera, sempre disposta a me ajudar, sem medir esforços.

Às amigas de “república” e colegas da turma de pós-graduação, Fernanda e Paulista, pela amizade, carinho, críticas, sugestões e paciência nesses anos de convívio.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos pela disponibilização do Laboratório de Processos Fermentativos, que proporcionou a infra-estrutura necessária para a realização dos experimentos.

À CAPES pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho através da concessão de uma bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Enzimas .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1 Pectinases.....</b>	<b>3</b>
2.1.1.1 Classificação e modo de ação das pectinases.....	5
2.1.1.2 Ocorrência e agentes produtores.....	8
2.1.1.3 Aplicações das pectinases.....	9
2.1.2 Proteases.....	10
2.1.3 Xilanases.....	10
<b>2.2 Fermentação em Meio Semi-Sólido.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Definição.....	11
2.2.2 Principais características da fermentação semi-sólida.....	11
2.2.3 Fatores que influenciam na fermentação semi-sólida .....	12
2.2.4 Aplicações da fermentação semi-sólida .....	13
<b>2.3 Medida da Biomassa.....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Método da glicosamina.....	14
<b>2.4 Biorreatores para Fermentação Semi-Sólida.....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Biorreatores de coluna .....	17
<b>2.5 Fungos Filamentosos .....</b>	<b>17</b>
2.5.1 <i>Aspergillus niger</i> .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Microrganismo.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Manutenção e Ativação do Microrganismo .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Inoculação do Meio de Sabugo de Milho.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Meios de Cultivo .....</b>	<b>19</b>
3.4.1 Meio básico - manutenção.....	19
3.4.2 Meio de sabugo de milho – produção de conídios .....	20
3.4.3 Meio de fermentação .....	20
<b>3.5 Preparação do Inóculo para Fermentação Semi-Sólida .....</b>	<b>21</b>
<b>3.6 Fermentação em Meio Semi-Sólido.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7 Planejamento Experimental .....</b>	<b>22</b>
3.7.1 Efeito da concentração das fontes de carbono e nitrogênio na síntese enzimática .....	22



3.7.2	Efeito da aeração e da umidade inicial do meio de fermentação na síntese enzimática.....	23
3.7.3	Efeito das fontes de nitrogênio e da concentração da fonte de fósforo na síntese enzimática.....	23
3.7.4	Cinética da fermentação .....	23
3.8	Recuperação do Extrato Enzimático .....	23
3.9	Determinações Quantitativas.....	23
3.9.1	Determinação da atividade de poligalacturonase.....	24
3.9.2	Determinação da atividade de protease.....	24
3.9.3	Determinação da atividade de pectinoliase .....	25
3.9.4	Determinação da atividade de pectinesterase .....	25
3.9.5	Determinação da atividade de xilanase .....	25
3.9.6	Quantificação celular .....	26
3.9.7	Determinação da umidade .....	27
3.10	Análise Estatística.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1	Caracterização da Matéria-Prima .....	28
4.2	Efeito da Concentração das Fontes de Nitrogênio e Carbono na Síntese Enzimática .....	29
4.3	Efeito da Aeração e da Umidade Inicial do Meio na Síntese Enzimática....	31
4.4	Efeito das Fontes de Nitrogênio e da Concentração da Fonte de Fósforo na Síntese Enzimática.....	35
4.5	Estudo Cinético do Processo.....	37
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	42
5.1	Conclusões .....	42
5.2	Sugestões.....	42
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição do meio básico .....	20
Tabela 3.2 – Soluções para preparo do meio de sabugo de milho.....	20
Tabela 3.3 – Composição do meio de fermentação.....	21
Tabela 3.4 – Preparo das soluções de acetilacetona e p-dimetilaminobenzaldeído .....	26
Tabela 3.5 – Codificação e distribuição das variáveis nos diferentes níveis do planejamento.....	27
Tabela 4.1 – Composição centesimal das matérias-primas (g/100g).....	28
Tabela 4.2 – Atividades poligalacturonase e protease e umidade final do meio, tendo como variáveis a proporção de resíduo de maracujá (CM) em farelo de trigo (CT) e a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (CS) .....	29
Tabela 4.3 – Atividades de poligalacturonase e protease e umidade final do meio, tendo como variáveis a aeração e a umidade inicial do meio .....	32
Tabela 4.4 – Atividades de poligalacturonase e protease e umidade final do meio, tendo como variáveis a fonte de nitrogênio e a concentração de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ....	35
Tabela 4.5 – Atividades das enzimas poligalacturonase, protease e pectinesterase ao longo da fermentação .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura primária das substâncias pécticas .....	4
Figura 2.2 – Reação de solubilização da protopectina .....	5
Figura 2.3 – Modo de ação da poligalacturonase .....	6
Figura 2.4 – Modo de ação das liases .....	7
Figura 2.5 – Modo de ação das pectinesterases .....	7
Figura 3.1 – Unidade experimental utilizada para a fermentação semi-sólida .....	22
Figura 4.1 – Efeito das concentrações de resíduo de maracujá (CM) e sulfato de amônio (CS) sobre a atividade de poligalacturonase .....	30
Figura 4.2 – Superfície de resposta da atividade de poligalacturonase em função dos valores codificados de concentrações de resíduo de maracujá (CM) e sulfato de amônio (CS). .....	31
Figura 4.3 – Efeito da aeração e da umidade inicial do meio sobre a atividade poligalacturonásica.....	34
Figura 4.4 – Superfície de resposta da atividade de poligalacturonase em função dos valores codificados da umidade inicial do meio e da aeração .....	34
Figura 4.5 – Atividade poligalacturonase em função da concentração de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , em 48 horas de fermentação semi-sólida, com diferentes fontes de nitrogênio.....	36
Figura 4.6 – Cinética de produção das enzimas poligalacturonase, protease e pectinesterase pela linhagem <i>A. niger</i> mutante 3T5B8 em meio semi-sólido.....	38
Figura 4.7 – Cinética do crescimento microbiano medido pelo teor de glicosamina e da umidade do meio de fermentação .....	41

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 2.1 – Ocorrência e principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas.....	8
Quadro 2.2 – Exemplos de aplicações da fermentação semi-sólida .....	15

## RESUMO

MENEZES, Gianáina Domingues Giacomini de. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 55p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

O cultivo do fungo mutante *Aspergillus niger* 3T5B8 foi realizado em biorreatores de coluna contendo meio semi-sólido, visando a produção de poligalacturonase. Com o intuito de estabelecer as condições ótimas de fermentação, dentro dos intervalos avaliados, foram realizadas fermentações com período estabelecido de 48 horas, utilizando-se um planejamento experimental fatorial  $3^2$  e os resultados foram avaliados usando o programa computacional STATISTICA for Windows. Inicialmente, avaliou-se os efeitos das concentrações do resíduo de maracujá (CM) e de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (CS), em meio de farelo de trigo. A atividade poligalacturonase máxima de 9,96 U/mL foi obtida nas concentrações de resíduo de maracujá e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 25% e 0,9%, respectivamente. Com base nos coeficientes de regressão, foi construído um modelo estatístico que relaciona a atividade poligalacturonase com os fatores CM e CS, permitindo encontrar as melhores concentrações de CM (33,25%) e CS (0,94%) para produção de poligalacturonase. Na seqüência, foram avaliados os efeitos da aeração e da umidade inicial do meio. Ambas as variáveis tiveram efeito significativo na produção da enzima. Observou-se que a maior atividade de poligalacturonase (10,70 U/mL) foi obtida com a taxa de aeração de 0,5vvm em meio com 60% de umidade inicial. Segundo o modelo ajustado, o melhor teor de umidade inicial do meio foi de 62,5%. Por último, foram avaliadas as fontes de nitrogênio e a concentração da fonte de fósforo, que mostraram-se significativas, em termos de produção de poligalacturonase, quando submetidas à análise de variância. Com base no teste de Tukey, a fonte de nitrogênio mais adequada foi a uréia e a concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que proporcionou maior atividade de poligalacturonase (11,51 U/mL) foi 0,30%. Após seleção prévia das condições de fermentação, foi conduzida a cinética de produção da enzima, por 96 horas. O meio de fermentação, formulado com 33,25% de resíduo de maracujá e 66,75% de farelo de trigo, umidificados a 62,5% com solução 0,43% de uréia e 0,30% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em HCl 0,1M, foi inoculado com *Aspergillus niger* 3T5B8 na concentração de  $10^7$  conídios/g de meio. As colunas cilíndricas, com aproximadamente 14g de meio foram aeradas com fluxo ascendente de ar de 0,5vvm a 32°C. O extrato enzimático foi extraído com tampão acetato de sódio pH 4,5, sob agitação por 1 hora a 32°C, seguido por filtração em membrana. A biomassa foi quantificada pelo método da glicosamina e foram determinadas as atividades das enzimas poligalacturonase, pectinoliase, pectinesterase, protease e xilanase. O valor máximo de 12,01 U/mL da atividade poligalacturonase foi obtido após 64h de fermentação. Neste tempo, a atividade protease foi de 5,78 U/mL, o teor de glicosamina de 21,54 mg/g e a umidade final de 57,27%. As atividades de xilanase e pectinoliase não foram detectadas, enquanto a atividade pectinesterase não ultrapassou 1,0 U/mL. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar a eficiência do processo fermentativo em biorreatores de coluna e a potencialidade do uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono de baixo custo para a composição de meios de fermentação.

**Palavras chave:** resíduo de maracujá, farelo de trigo, teor de glicosamina

## ABSTRACT

MENEZES, Gianáina Domingues Giacomini de. **Production of polygalacturonase by the *Aspergillus niger* 3T5B8 mutant strain by solid state fermentation in column bioreactors.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 55p. (Dissertation, Master in Chemical Engineering).

The culture of *Aspergillus niger* 3T5B8 mutant strain was carried out in column bioreactors containing semi-solid medium, aiming at producing polygalacturonase. In order to establish the optimum conditions, within the evaluated intervals, the fermentations were carried out for a 48-hour period based on an experimental planning by a factor of  $3^2$ . Results were evaluated by using the software STATISTICA for Windows. Initially, the effects of the passion fruit residue (CM) and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (CS) concentrations on a wheat bran medium were evaluated. The maximum polygalacturonase activity, 9.96 U/mL, was achieved in 25% and 0.9% concentrations of passion fruit residue and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , respectively. Based on regression coefficients, a statistical model, which relates the polygalacturonase activity with the factors CM and CS, was developed and, therefore, enabling the determination of the best conditions of CM (33.25%) and CS (0.94%) for the polygalacturonase production. Further, the effects of the aeration and the initial moisture content of the medium were evaluated. Both variables had significant effect in the enzyme production. It was observed that the highest polygalacturonase activity (10.70 U/mL) was achieved with an airflow rate of 0.5 vvm in the medium with 60% of initial moisture. According to the adjusted model, the best initial moisture content of the medium was of 62.5%. Finally, a variance analysis of the nitrogen source and the phosphor source concentration was performed, showing that both factors were significant to polygalacturonase production. Based on the Tukey test, the most efficient nitrogen source was urea, and the  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration, which provided the highest activity of polygalacturonase (11.51 U/mL), was 0.3%. After the previous selection of the fermentation conditions, the kinetic of enzyme production was carried out for 96 hours. The fermentation medium, which was formulated with 33.25% of passion fruit residue and 66.75% of wheat bran and humidified at 62.5% with 0.43% of urea and 0.30% of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution in HCl 0.1M, was inoculated with *Aspergillus niger* 3T5B8 in the concentration of  $10^7$  spores/g in the medium. The cylindrical columns, having approximately 14g of the medium, were aerated with ascending airflow rate of 0,5 vvm at 32°C. The enzymatic extract was removed with buffer solution of sodium acetate at pH 4.5, by means of agitation for 1 hour at 32°C, followed by membrane filtration. The biomass was quantified by the glucosamine method and the enzymes activities of polygalacturonase, pectin lyase, pectin esterase, protease and xylanase were determined. The maximum value of 12.01 U/mL for the polygalacturonase activity was reached after 64 hours of fermentation. During that time, the protease activity was of 5.78 U/mL, the glucosamine content was of 21.54 mg/g and the final moisture was of 57.27%. The xylanase and pectin lyase activities had not been detected, while the pectin esterase activity did not exceed 1.0 U/mL. Based on the results, it was possible to verify the efficiency of the fermentative process in column bioreactors and the potentiality of using agro-industrial residues as carbon source of low cost for the composition of fermentation media.

**Key Words:** passion fruit residue, wheat bran, glucosamine content

# 1 INTRODUÇÃO

A economia brasileira é uma das mais importantes economias de base agrícola do mundo, onde destacam-se a produção do café, da cana-de-açúcar, da soja e a fruticultura (PANDEY *et al.*, 2000b). Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada a alternativas que conduzam à minimização ou ao reaproveitamento dos resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. A indústria alimentícia, especialmente a indústria de sucos, gera uma enorme quantidade de resíduos provenientes do processamento das frutas, obtendo-se ao final do processo quantidades apreciáveis de casca, caroço e sementes (DANIEL *et al.*, 1996). No processamento do maracujá (*Passiflora edulis*) a polpa representa apenas 33% do fruto, o restante é resíduo que equivale a, aproximadamente, 60% de casca e albedo e cerca de 7 a 8% de sementes. É importante destacar que a produção anual de maracujá no Brasil é de 478.652 toneladas, que representa 90% da produção mundial (IBGE, 2002).

Devido ao constante crescimento do setor agrícola, especial atenção deve ser destinada aos processos biotecnológicos industriais que representam significativa relevância social e econômica, haja visto a possibilidade de utilização de recursos naturais renováveis, abundantes no Brasil, e o grande número de metabólitos de interesse industrial que podem ser gerados a partir destes processos.

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos não somente proporciona substratos alternativos, que serão convertidos em produtos de valor comercial agregado, como também ajuda a minimizar os problemas ambientais, visto que a poluição ambiental é uma consequência direta do desenvolvimento tecnológico (SOCCOL & VANDENBERRG, 2003; SILVA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002). Dessa forma, a implementação de tecnologias adequadas, sob o ponto de vista energético e de preservação do meio ambiente, fazendo uso de materiais renováveis, é uma necessidade que se faz presente em todos os segmentos industriais.

Um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial, em amplo desenvolvimento, é a obtenção de enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser sempre investigados, pois variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (BRAVO *et al.*, 2000). Portanto, para que a aplicação das pectinases se torne viável, é essencial o estudo tanto de variáveis que viabilizem a sua produção em larga escala quanto de condições adequadas ao seu uso, tais como: seleção de bons microrganismos produtores com base na especificidade da cepa, determinação do tempo de fermentação, da temperatura, do tipo de biorreator a ser empregado no processo, da composição adequada do meio de cultivo, etc (CASTILHO *et al.*, 1996; EL-RAFAI *et al.*, 1984; SILVA *et al.*, 2002).

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo geral a produção da enzima poligalacturonase por fermentação semi-sólida em colunas aeradas, utilizando *Aspergillus niger* 3T5B8 como agente de fermentação e uma mistura de resíduo do processamento do maracujá e farelo de trigo, como substrato.

Para que o objetivo principal fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

- determinação da melhor composição do meio sólido e da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mais adequada;

- determinação das melhores condições de operação dos reatores de coluna em termos de nível de aeração e umidade inicial do meio;
- determinação da fonte de nitrogênio mais apropriada e da melhor concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Enzimas

As enzimas são moléculas protéicas com propriedades catalíticas importantes, tais como alta conversão, especificidade na transformação substrato-produto e elevada atividade em condições ambientais moderadas. Assim, a sua aplicação como catalisador de processos é de grande interesse (CASTILHO *et al.*, 1996).

As enzimas podem encontrar-se nas formas líquida ou sólida. Enzimas, em geral, são solúveis em água e praticamente insolúveis em álcool, clorofórmio e éter. Os preparados enzimáticos líquidos estão geralmente em soluções aquosas, tendo ponto de ebulição levemente acima de 100°C e apresentam coloração marrom escura, enquanto os preparados enzimáticos sólidos encontram-se na forma de pó fino e não cristalino, cuja cor varia do branco ao marrom claro (NOSB, 1999).

As preparações comerciais de enzimas são obtidas de fontes animais, vegetais ou por fermentação com o uso de microrganismos (BORRIS, 1987). As células microbianas formadas pelo processo de fermentação são fontes potenciais de enzimas, oferecendo uma série de vantagens: permitem um aumento de produção em menor tempo, têm facilidade de serem cultivadas em ambientes controlados, além de permitirem a produção de várias enzimas devido à sua natureza diversa (FROST & MOSS, 1987).

Os microrganismos que produzem enzimas comerciais são, na maioria das vezes, fungos como *A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor meihei* e leveduras como *Candida* spp e *Saccharomyces* spp. Várias pesquisas têm sido conduzidas com fungos geneticamente modificados e outros microrganismos com finalidade de se obter um aumento no rendimento e na estabilidade das enzimas (NOSB, 1999).

As enzimas obtidas por processos fermentativos têm sido amplamente pesquisadas e utilizadas em todo o mundo, de modo que seu uso e produção vem a ser uma das áreas de maior interesse da indústria biotecnológica (FULLBROOK, 1983).

A aplicação industrial de enzimas é determinada pela sua especificidade, atividade, estabilidade de armazenamento e uso, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é influenciada pela sua concentração e a do seu substrato, concentração de cofatores, efetores alostéricos, a presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação. A maneira como cada uma destas variáveis afeta a atividade enzimática é o objeto de estudo da cinética enzimática.

#### 2.1.1 Pectinases

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são os catalisadores responsáveis pela pectólise, um fenômeno associado a muitos processos biológicos que envolvem os vegetais superiores (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

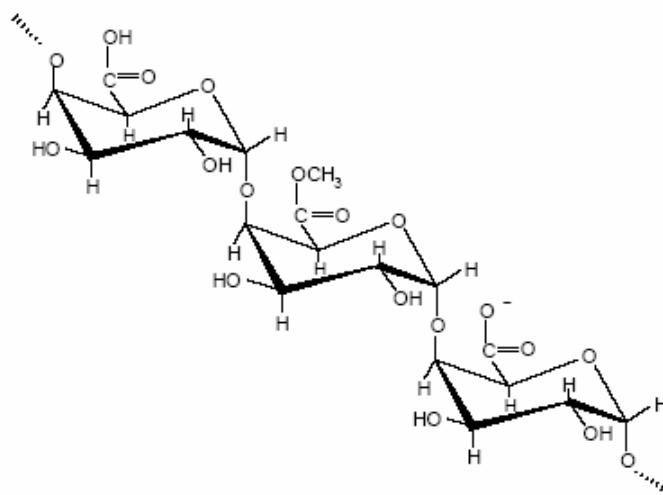
As pectinases têm como substratos naturais as substâncias pécticas, que são polissacarídeos muito difundidos na natureza e que, juntamente com outros componentes como amido, celulose, hemicelulose e lignina, formam o material estrutural da parede celular das plantas (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976; WHITAKER, 1984).

Quimicamente, as substâncias pécticas são heteropolissacarídeos ramificados, cuja cadeia principal é constituída por resíduos de ácido D-galacturônico, parcialmente



esterificados com grupos metila, e polimerizados através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

A estrutura química das substâncias pécnicas está ilustrada na Figura 2.1.



**Figura 2.1** – Estrutura primária das substâncias pécnicas  
Fonte: HOUDERT & MULLER, 1991

Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das substâncias pécnicas, proporções variáveis de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e traços de 2-O-metilfucose também podem ser encontrados (JARVIS, 1984; LEITÃO *et al.*, 1995).

O grau de esterificação, a proporção de açúcares neutros e o grau de polimerização são características responsáveis pela heterogeneidade das substâncias pécnicas provenientes de diferentes origens. Por isso, o termo substâncias pécnicas é muito genérico e compreende um grupo de derivados complexos de carboidratos, que ocorrem na lamela média e na parede celular primária das plantas, dentre os quais destacam-se as pectinas (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976).

As pectinas contribuem para a adesão entre as células e para a resistência mecânica da parede celular. Além de seu papel importante no crescimento das células, elas estão envolvidas em interações com agentes patogênicos, e a sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos e vegetais em geral, durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (BRANDÃO & ANDRADE, 1999).

Segundo ALKORTA *et al.* (1998), a Sociedade Americana de Química classificou as substâncias pécnicas em quatro grupos principais:

- Protopectinas: são altamente esterificadas, insolúveis em água e por aquecimento, em presença de ácidos diluídos formam ácidos pectínicos ou ácidos pécnicos;
- Ácidos pécnicos: cadeias de ácidos D-galacturônicos livres de metoxilas, em presença de água formam soluções coloidais. Os sais de ácidos pécnicos são conhecidos como pectatos;
- Ácidos pectínicos: substâncias coloidais, não necessariamente solúveis em água, constituídas por ácidos poligalacturônicos com número significativo de metoxilas na forma de ésteres. Os sais de ácidos pectínicos são chamados de

pectinatos;

- Pectinas: ácidos pectínicos solúveis em água, com grau de esterificação e grau de neutralização variável.

De acordo com ROSENBOHM *et al.* (2003), pectinas com alto grau de metoxilação (maior que 7%) formam gel em meio ácido com adição de açúcares, constituindo a base de geléias e conservas de frutas; enquanto as pectinas com baixo grau de metoxilação (menor que 7%) formam gel na presença de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), e são utilizadas na produção de geléias especiais para fins dietéticos.

A pectina é um componente da fração fibra alimentar, classificada como fibra solúvel devido à sua solubilidade em água (TRUSWELL, 1997). Altos teores de pectina são encontrados principalmente nos frutos cítricos, em especial no albedo (BELITZ & GROSCH, 1988).

Nos processos industriais, as diferentes formas de ação das enzimas pectinolíticas sobre as substâncias pecticas são um parâmetro importante para conduzir ao aproveitamento total da capacidade catalítica destas enzimas.

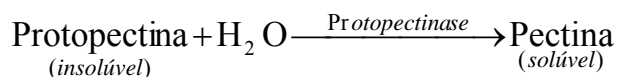
### 2.1.1.1 Classificação e modo de ação das pectinases

As enzimas pectinolíticas atuam de forma sinérgica e são classificadas de acordo com o modo de ação sobre o substrato (CASTILHO *et al.*, 1996).

Devido à diversidade estrutural das substâncias pecticas, as pectinases têm diferentes mecanismos de ação, podendo ser divididas em dois grupos principais: enzimas despolimerizantes, que quebram a cadeia da pectina por hidrólise ou clivagem transeliminativa (CODNER, 2001) e enzimas desmetoxilantes, que atuam sobre os grupos metoxílicos presentes no substrato, sem alterar o tamanho da cadeia (MALVESSI & SILVEIRA, 2004).

De acordo com REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC (1976), para classificar as enzimas despolimerizantes é necessário levar-se em consideração alguns aspectos, tais como, tipo de substrato sobre o qual a enzima preferencialmente atua (ácido pectico, protopectina ou pectina), modo de ação, podendo ser por transeliminação (liases) ou por hidrólise (hidrolases), e mecanismo de quebra das ligações glicosídicas, se ocorre ao acaso (endo) ou a partir das extremidades não redutoras da cadeia (exo).

A protopectinase, também conhecida como pectinosinase, catalisa a solubilização da protopectina (BRINTON *et al.*, 1927 *apud* JAYANI *et al.*, 2005), segundo a reação esquematizada na Figura 2.2.



**Figura 2.2** – Reação de solubilização da protopectina

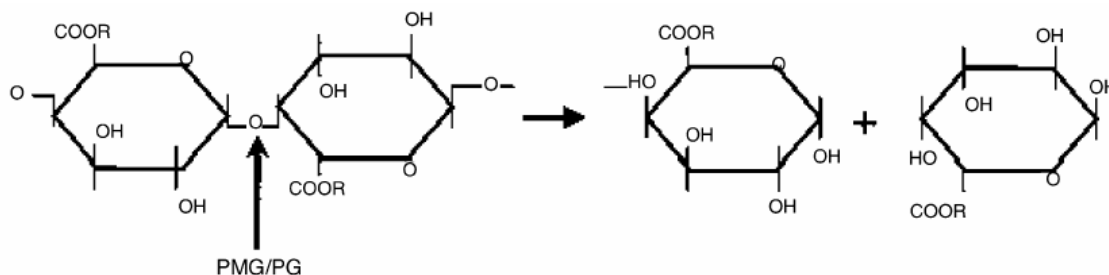
Fonte: JAYANI *et al.*, 2005

Conforme SAKAI & OKUSHIMA (1982) e SAKAMOTO *et al.* (1994), as protopectinases podem ser divididas em duas classes, com base no seu mecanismo de reação. A protopectinase tipo A reage na cadeia principal da protopectina, ou seja, na região do ácido poligalacturônico e a protopectinase tipo B atua nas cadeias polissacarídicas que conectam a cadeia de ácido poligalacturônico e os constituintes da parede celular.

A atividade de protopectinase é determinada pela quantidade total de substância pectica liberada da protopectina pelo método do ácido carbazol-sulfúrico (SIEBERT & ANTO, 1946 *apud* JAYANI *et al.*, 2005).

As poligalacturonases são as enzimas pectinolíticas que catalisam a clivagem hidrolítica da cadeia de ácido poligalacturônico (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). As endo-poligalacturonases (EC 3.2.1.15) hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de forma randômica, produzindo uma série de oligogalacturonatos, reduzindo rapidamente o tamanho e a viscosidade da molécula de substrato. As exo-poligalacturonases (EC 3.2.1.67) agem pelo extremo não redutor da molécula de substrato, liberando resíduos de galacturonato.

O modo de ação da poligalacturonase é exemplificado na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Modo de ação da poligalacturonase  
 Fonte: SATHYANARAYANA & PANDA, 2003

Para KONNO *et al.* (1983) é aceitável que a exo-poligalacturonase em conjunto com a endo-poligalacturonase promovam a hidrólise completa da pectina, uma vez que a endo-poligalacturonase participa da liberação das frações insolúveis da pectina presente nos diversos frutos e, após essa solubilização, a exo-poligalacturonase catalisa a degradação das frações livres de pectina.

As poligalacturonases podem ter suas atividades analisadas pelo surgimento de grupos redutores ou pela redução da viscosidade da solução do substrato (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976).

As liases (ou transeliminases) efetuam a quebra da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 pelo mecanismo de  $\beta$ -eliminação, sem absorver água do meio reacional, formando uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 (CODNER, 2001; ALBERSHEIM *et al.*, 1960 *apud* JAYANI *et al.*, 2005).

De acordo com o substrato preferencial, as liases são classificadas em: pectinoliases e pectatoliases (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

As pectinoliases (EC 4.2.2.10) despolimerizam as pectinas com alto grau de metoxilação, causando uma rápida queda na viscosidade da solução de substrato (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). Dentre as enzimas pectinolíticas, a pectinoliase é particularmente interessante por despolimerizar pectinas sem alterar seu grau de esterificação e sem a necessidade de ação prévia de outra enzima do complexo pectinolítico (ALANÃ *et al.*, 1990; MINUSSI *et al.*, 1998).

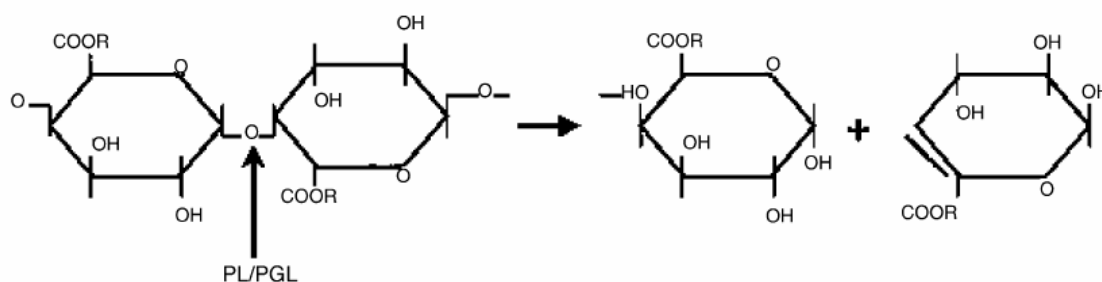
As pectinoliases são preferíveis no processamento de sucos e vinhos, pois evitam a produção de metanol e com isso os ésteres voláteis responsáveis pelo aroma específico das frutas não são afetados (DELGADO *et al.*, 1992; TARAGANO & PILOSOFF, 1999).

Para a medida da atividade pectinoliase pode-se utilizar a queda da viscosidade em soluções de pectina altamente esterificadas ou a formação de ligações duplas detectáveis em absorbância a 235 nm (WHITAKER, 1990).

As pectatoliases despolimerizam pectinas parcialmente ou completamente

desesterificadas. As endo-pectatolases (EC 4.2.2.2) clivam a cadeia de ácidos pécicos de forma randômica, enquanto as exo-pectatolases (EC 4.2.2.9) liberam dímeros insaturados a partir da extremidade da cadeia de substrato. Neste caso, a atividade pode ser determinada através do máximo de absorbância a 235 nm (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

O modo de ação das liases é exemplificado na Figura 2.4.

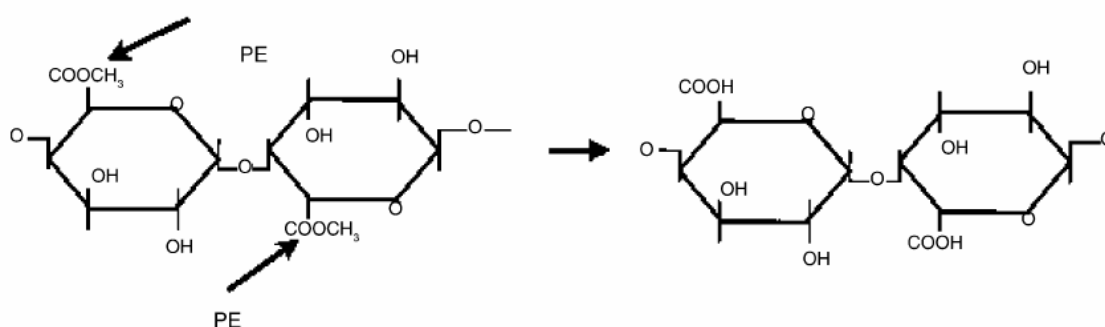


**Figura 2.4** – Modo de ação das liases  
 Fonte: SATHYANARAYANA & PANDA, 2003

No complexo pectinolítico, a única enzima não despolimerizante é a pectinesterase (EC 3.1.11), que tem como base de sua classificação o nome sistemático de pectina pectil-hidrolase (WHITAKER, 1984).

Esta enzima catalisa a desesterificação da pectina, transformando-a em pectina de baixo grau de metoxilação ou ácido pécico. Durante o desdobramento são gerados grupos carboxílicos livres e metanol (ROMBOUTS & PILNIK, 1980; COSGROVE, 1997).

O modo de ação da pectinesterase é exemplificado na Figura 2.5.



**Figura 2.5** – Modo de ação das pectinesterases  
 Fonte: SATHYANARAYANA & PANDA, 2003

Para determinação da atividade pectinesterase podem ser utilizados tanto os grupos carboxílicos livres gerados, quanto o metanol liberado na reação. Os métodos usados para determinação da atividade são: titulação automática, medida de pH e determinação do teor de metanol por cromatografia gasosa (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976; ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

### 2.1.1.2 Ocorrência e agentes produtores

As enzimas pectinolíticas são produzidas principalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BRAVO *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2000).

A utilização de bactérias, leveduras ou fungos filamentosos despertam grande interesse de estudo em virtude de inúmeras vantagens apresentadas, tais como: não necessitam de amplos espaços para seu crescimento; conseguem degradar e crescer em amplos substratos, inclusive em resíduos industriais, os quais podem ser aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada; possuem um crescimento rápido quando as condições são favoráveis para o seu crescimento e podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes desejados (BRAVO *et al.*, 2000).

No Quadro 2.1 podem ser observados a ocorrência e os principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas.

**Quadro 2.1** – Ocorrência e principais agentes produtores das enzimas pectinolíticas

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

Fonte: JAYANI *et al.*, 2005

As enzimas usadas nas indústrias de alimentos são de origem fúngica porque os fungos são excelentes produtores de enzimas pectinolíticas (SOARES *et al.*, 1999). Cepas do fungo filamentosso *A. niger* são as mais utilizadas na produção comercial de pectinases, pois suas características toxicológicas são aprovadas em termos legislativos (MALVESSI & SILVEIRA, 2004).

### 2.1.1.3 Aplicações das pectinases

A aplicação comercial das pectinases começou em 1930, com a clarificação de vinhos e sucos de frutas. Mas somente em 1960, a natureza química dos tecidos vegetais tornou-se aparente e com esses conhecimentos, cientistas começaram a utilizar as enzimas em grande escala de modo mais produtivo (KASHYAP *et al.*, 2001).

A utilização de enzimas microbianas tem tido vasta aplicação tecnológica em diferentes processos industriais em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico (MITCHELL & LONSANE, 1992; PICCOLI-VALLE *et al.*, 2001).

O uso comercial das pectinases está principalmente relacionado à indústria de alimentos, sendo que sua maior aplicação encontra-se na clarificação de sucos de frutas (CASTILHO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2005a). O objetivo principal do tratamento de clarificação empregado no processamento industrial de sucos de frutas é remover instantaneamente os constituintes responsáveis pela turbidez do suco recentemente produzido e substâncias que possam causar turvação e formação de precipitados durante a estocagem, na reconstituição do produto concentrado ou após o envasamento do suco (MEYER *et al.*, 2001). A adição de pectinases proporciona um processamento mais eficiente da fruta, melhorando a sacarificação o que confere ao suco um sabor mais adocicado, reduzindo gastos e energia utilizados no processo de produção, melhorando a cor e o aroma do suco, prevenindo a formação de gel e aumentando o rendimento do suco (SCHOLS *et al.*, 1991; NOSB, 1999; COLLET *et al.*, 2005).

As enzimas pectinolíticas também são utilizadas para melhorar as características visuais (cor e turbidez) e a estabilidade de vinhos tintos. Elas são adicionadas durante o esmagamento das uvas, antes da fermentação (REVILLA & GANZALEZ-SAN JOSE, 2003).

Na indústria têxtil, as pectinases são utilizadas juntamente com as amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas em diversas aplicações. Na desengomagem das fibras de algodão, as pectinases substituem a soda cáustica, que era utilizada anteriormente na remoção das impurezas não celulósicas, de maneira segura e ecologicamente correta, sem causar efeitos negativos na degradação da celulose (HOONDAL *et al.*, 2000). Também atuam na desengomagem de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami, substituindo o tratamento químico que é poluente, tóxico e não biodegradável (BARENSE *et al.*, 2001; KAPOOR *et al.*, 2001).

As pectinases aceleram a fermentação de chás e eliminam a formação de espumas provenientes de chás em pó, por hidrólise da pectina. Elas também são usadas na fermentação do café para remoção da casca mucilaginosa (CARR, 1985; KASHIAP *et al.*, 2001).

Durante o processamento do papel, as pectinases podem despolimerizar as pectinas e, conseqüentemente, diminuir a demanda de cloro utilizado no branqueamento da polpa celulósica (VIKARI *et al.*, 2001; REID & RICHARD, 2004).

As quitosanas, que são polímeros lineares derivados da quitina, podem ser despolimerizadas por hidrólise enzimática (KITUR *et al.*, 2003). As pectinases despolimerizam quitosanas de forma simples, rápida e de fácil controle, originando moléculas de quitosana de baixo peso molecular, que são mais ativas biologicamente,

tendo diversas aplicações na agricultura, medicina e como cosmético.

Elevados níveis de poligalacturonase são utilizados na maceração de frutos e vegetais destinados à alimentação de bebês (SILVA *et al.*, 2005a). As pectinases também auxiliam na extração de azeite de oliva e de óleos essenciais, aumentando o rendimento e eliminando as propriedades emulsificantes da pectina, que interferem na extração dos óleos vegetais (SCOTT, 1978 *apud* JAYANI *et al.*, 2005; PICCOLI-VALLE *et al.*, 2001). Outro emprego das pectinases é referente ao tratamento de madeiras comerciais com a finalidade de aumentar a permeabilidade aos preservantes utilizados (CASTILHO *et al.*, 1996).

### 2.1.2 Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas em moléculas de proteína (RAO *et al.*, 1998). As ligações peptídicas são as ligações covalentes mais importantes que unem os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos, podendo ser extracelulares ou intracelulares, ligadas ou não à membrana. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas, tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido à sua grande diversidade bioquímica, permitindo que o rendimento das enzimas proteolíticas por fermentação possa ser incrementado através de manipulação genética e melhoramento das condições de cultivo (NEURATH, 1989; SAID & PIETRO, 2002).

As proteases microbianas representam 40% da venda mundial de enzimas e são preferidas por possuírem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia e, além disso, seu custo de produção é menor do que o das proteases de origem vegetal ou animal (SAID & PIETRO, 2002).

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais amplos grupos de enzimas industriais. Suas aplicações envolvem os setores biotecnológico, medicinal e industrial, atuando principalmente nas indústrias de detergentes, alimentos e farmacêutica (RAO *et al.*, 1998; SAID & PIETRO, 2002).

### 2.1.3 Xilanases

Segundo DEKKER & RICHARDS (1976) *apud* REZENDE *et al.* (2002), as xilanases pertencem ao grupo das enzimas hemicelulolíticas que hidrolisam as  $\beta$ -1,4-xilanas presentes em materiais lignocelulósicos.

A hemicelulose é a segunda fração vegetal mais disponível na natureza (MAGGE & KOSARIC, 1985). E a xilana é o principal polissacarídeo hemicelulósico da madeira e dos resíduos agroindustriais, abrangendo de 20 a 35% do peso seco. É um heteropolissacarídeo, cuja estrutura consiste de uma cadeia principal de resíduos de D-xilose unida por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 podendo apresentar ramificações contendo, principalmente, resíduos acetil, arabinosil e gluconosil, dependendo do vegetal em que se encontra (SENTHILKUMAR *et al.*, 2005).

A hemicelulose pode ser convertida a monossacarídeos por hidrólises ácida ou enzimática, sendo que a hidrólise enzimática é vista como um processo mais seguro e específico (YOON *et al.*, 2005).

As xilanases são secretadas pela maioria das bactérias e fungos filamentosos, e

por algumas leveduras (REZENDE *et al.*, 2002).

O uso das xilanases no aproveitamento de materiais lignocelulósicos tem sido estudado em função de suas várias aplicações nas indústrias química, farmacêutica, de papel e de alimentos (LUCENA-NETO & FERREIRA-FILHO, 2004). Na indústria química elas são usadas na produção de xilitol e etanol (PANDEY *et al.*, 2000a). Na indústria farmacêutica, os monômeros de várias hemiceluloses são aproveitados na produção de diferentes antibióticos (THOMPSON, 1983). Na indústria de papel e celulose, as xilanases são utilizadas no pré-tratamento de polpas celulósicas, melhorando a eficiência do branqueamento químico convencional e diminuindo a demanda de cloro, de modo que auxilia no controle da poluição por compostos organoclorados (BEG *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004). Tolerância a elevados valores de pH e temperatura são propriedades desejáveis das xilanases para sua utilização efetiva no processo de biobranqueamento (BUCHERT *et al.*, 1994).

## **2.2 Fermentação em Meio Semi-Sólido**

### **2.2.1 Definição**

A fermentação em meio semi-sólido é definida como sendo o processo fermentativo no qual o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos ocorrem na superfície do substrato sólido próximo à ausência de água livre (PANDEY *et al.*, 2000b). Uma descrição mais detalhada acerca da fermentação em meio semi-sólido é feita por BRAMORSKI *et al.* (1998), que definem a fermentação em meio semi-sólido como uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz.

### **2.2.2 Principais características da fermentação semi-sólida**

O meio de cultivo para fermentação semi-sólida é simples, na maioria das vezes, natural. São usados substratos comuns, geralmente, resíduos agroindustriais com elevados teores de carboidratos ou proteínas. O único componente necessário a ser adicionado ao meio é água, embora, ocasionalmente, outros nutrientes como fonte de nitrogênio ou minerais possam ser adicionados (AIDOO *et al.*, 1981).

Os resíduos de processos agroindustriais podem ser usados como substrato para crescimento microbiano, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (MAHMOOD *et al.*, 1998).

Caracterizar a fermentação semi-sólida, via de regra, leva a uma comparação com a fermentação submersa, para uma melhor compreensão do processo. A fermentação em meio semi-sólido apresenta vantagens sobre a fermentação submersa por ter um custo de produção mais viável, devido à pequena exigência energética e à facilidade na extração dos produtos (DANIEL *et al.*, 1996).

As condições de cultura do processo de fermentação em meio semi-sólido são mais similares ao habitat natural dos fungos filamentosos do que as condições de fermentação em cultura submersa, de modo que esses microrganismos são capazes de crescer satisfatoriamente no substrato sólido e excretar grandes quantidades de enzima (CASTILHO *et al.*, 2000a; SILVA *et al.*, 2005b).



Na fermentação semi-sólida utiliza-se o substrato úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da fermentação submersa, onde se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Como a maioria das bactérias requerem altos níveis de atividade de água, o processo semi-sólido exclui, ou reduz sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana (AIDOO *et al.*, 1981). No processo submerso, trabalha-se com valores altos de atividade de água e isso propicia um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos contaminantes.

Normalmente, grandes volumes de resíduos líquidos são gerados na fermentação submersa, e estes ainda podem apresentar grande atividade biológica. Já na fermentação semi-sólida a quantidade de resíduo líquido gerada é pequena (CASTILHO *et al.*, 2000a).

Na fermentação semi-sólida, utiliza-se um volume menor de solvente para a extração da enzima, o que reduz problemas relacionados à poluição e aos custos de extração (SINGH *et al.*, 1999; DE GREGORIO *et al.*, 2002).

No processo semi-sólido, o espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, considerando-se o rendimento do produto, e os meios sólidos de fermentação são concentrados, o que eleva a produtividade volumétrica. Enquanto na fermentação submersa, os biorreatores ocupam grandes espaços e o substrato é muito diluído, levando a baixas produtividades volumétricas (MARTINS *et al.*, 2002).

### **2.2.3 Fatores que influenciam na fermentação semi-sólida**

Aeração e transferência de oxigênio, temperatura e transferência de calor, atividade de água e umidade e a escolha adequada do microrganismo e do substrato são os principais fatores que determinam a eficiência do processo fermentativo, bem como a qualidade do produto obtido.

Para HAN (1987) o sistema de aeração, na fermentação semi-sólida, é simples, desde que o projeto do reator seja apropriado para permitir livre acesso do oxigênio atmosférico até o substrato. O autor especifica ainda que, neste tipo de fermentação, forma-se um filme de água sobre o substrato insolúvel, o que torna a difusão do oxigênio para água mais rápida do que no processo submerso, uma vez que, a solubilidade do oxigênio em água é muito baixa (0,0283%, a 25°C). Dessa forma, necessita-se de um nível menor de oxigênio para a fermentação semi-sólida. Por outro lado, LONSANE *et al.* (1991) relataram que o problema com a difusão de oxigênio, na fermentação semi-sólida, está relacionado à difusão do gás entre as partículas. Entretanto, independente da forma de transporte de oxigênio, a velocidade de transferência na fermentação semi-sólida é maior que na fermentação submersa.

A aeração tem como função principal o fornecimento de oxigênio, mas também é responsável pela remoção de calor, CO<sub>2</sub> e outros compostos voláteis. Segundo DURAND *et al.* (1988), a aeração é necessária na fermentação semi-sólida, devido a três fatores: manutenção das condições aeróbias, pois a pressão parcial do oxigênio e do CO<sub>2</sub> no gás são fatores críticos para o crescimento celular e formação do produto; controle da temperatura do substrato, pois em baixas condições de umidade há dificuldades para transferência de calor e, conseqüentemente, de controle de temperatura e, por fim, serve para regular o conteúdo de água do substrato, que influencia o crescimento celular e o metabolismo do cultivo sólido durante o processo.

Segundo HASAN *et al.* (1998), o controle da temperatura na fermentação semi-sólida, em nível industrial, é um problema de difícil resolução, onde as principais dificuldades na transferência de calor estão relacionadas às características térmicas dos materiais orgânicos e à baixa umidade presente no sistema.

A temperatura e a concentração de oxigênio, são as mesmas em qualquer ponto do leito, no início da fermentação. Mas, com o transcorrer da fermentação, ocorre a difusão do oxigênio no meio, permitindo a ocorrência de reações metabólicas que, liberam calor no sistema, o qual não é facilmente dissipado devido a baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Dessa forma, são gerados gradientes de temperatura, e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos, dependendo dos parâmetros de controle do sistema. A formação de zonas de alta temperatura, e baixa concentração de oxigênio, que podem ocorrer, afetam negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al.*, 1990).

Em fermentação semi-sólida é essencial o controle da temperatura do sistema, na faixa propícia ao crescimento do microrganismo, para possibilitar a eficiência do processo. Temperaturas elevadas afetam a germinação dos esporos, o crescimento celular e a formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos e a outras reações bioquímicas (HASAN *et al.*, 1998).

Os parâmetros fundamentais para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas são a atividade de água ( $A_w$ ) e a umidade dos substratos sólidos (PANDEY *et al.*, 2000a).

A natureza do material, o tipo de produto final desejado e a necessidade do microrganismo, determinam o nível de umidade adequado do substrato sólido (LONSANE *et al.*, 1985). A determinação da quantidade de líquido necessária para a manutenção da umidade do sistema é fundamental para o sucesso do processo pois, excesso de líquido no interior da matriz sólida leva a redução da porosidade do leito diminuindo a difusão do oxigênio, ao mesmo tempo que, propicia um ambiente mais favorável à contaminação bacteriana e à formação de hifas aéreas. Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato prejudicam o crescimento microbiano, pois comprometem a difusão de nutrientes e de oxigênio, podendo levar a falta de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento (LONSANE *et al.*, 1985; GERVAIS & MOLIN, 2003).

O tipo de microrganismo que pode crescer e formar produtos, em fermentação semi-sólida, é determinado, principalmente, pela atividade de água ( $A_w$ ) do meio. De acordo com MITCHELL *et al.* (2000) valores de  $A_w$  na ordem de 0,95 – 0,98 podem ser considerados típicos para os meios das fermentações semi-sólidas. Este nível de  $A_w$  é ideal para o crescimento de muitos fungos, especialmente os filamentosos.

O custo e a viabilidade de uso são os fatores primordiais a serem analisados na escolha do substrato mais adequado para a fermentação semi-sólida (PANDEY *et al.*, 2000a), por isso, na maioria das vezes, são utilizados resíduos agroindustriais. A utilização deste tipo de material é vantajosa economicamente, haja visto que o custo do processo é minimizado, já que estes resíduos são sub-produtos das indústrias de alimentos (CASTILHO *et al.*, 2000b).

Conforme PANDEY *et al.* (1992), na seleção do substrato é de suma importância a análise de fatores físicos, como o acesso do microrganismo ao substrato, já que este se desenvolve através da porosidade e do tamanho da partícula, e de fatores químicos, como a natureza do substrato e o seu grau de polimerização e cristalização.

#### **2.2.4 Aplicações da fermentação semi-sólida**

A fermentação em meio semi-sólido tem emergido como uma tecnologia apropriada para o manejo de resíduos agroindustriais, agregando a esses valor comercial

e destacando-se como uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de muitos bioprocessos, incluindo a produção em larga escala de enzimas industriais (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2004).

O Quadro 2.2 mostra alguns exemplos de aplicações da fermentação semi-sólida, com os respectivos substratos e microrganismos utilizados.

O Brasil segue a promissora tendência mundial do desenvolvimento de processos de fermentação em meio semi-sólido, não somente para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, mas também para a aplicação em indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, enriquecimento protéico de alimentos fermentados, detoxificação biológica, ácidos orgânicos, biopesticidas, pigmentos, goma xantana, ácido giberélico, cogumelos comestíveis, etanol, biogás, etc (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

## 2.3 Medida da Biomassa

Há uma grande dificuldade em se determinar a biomassa através de métodos diretos em fermentações semi-sólidas com fungos filamentosos, uma vez que estes se aderem à matriz sólida durante o crescimento, impossibilitando, assim, a separação entre o micélio e o substrato sólido (MITCHELL *et al.*, 2000).

A estimativa da biomassa microbiana, bem como o seu perfil ao longo do processo fermentativo, são de suma importância em estudos de metabolismo e no monitoramento da cinética, em fermentações semi-sólidas. Os métodos indiretos para dosagem da biomassa em processos semi-sólidos, baseiam-se na medida de alguma atividade metabólica ou de algum componente específico da biomassa (LEKHA & LONSANE, 1994). O indicador escolhido para representar o crescimento da biomassa deve ser constante durante o crescimento do microrganismo e sob diferentes condições de cultivo (SCOTTI *et al.*, 2001).

De acordo com DESGRANDES *et al.* (1991), os métodos indiretos para determinação da biomassa na fermentação em estado semi-sólido podem basear-se nos constituintes celulares (quitina, ergosterol, ácidos nucléicos, proteína), na atividade biológica (ATP, taxa de respiração e atividade imunológica) ou no consumo de algum componente do meio (nutrientes).

### 2.3.1 Método da glicosamina

O método de dosagem do conteúdo de glicosamina tem por princípio a quantificação da quitina, um constituinte da parede celular dos fungos que é um polímero linear insolúvel, constituído por ligações  $\alpha$ -1,4 de acetilglicosamina. O método de dosagem do monômero baseia-se na despolimerização, por hidrólise ácida ou básica, da molécula de quitina, seguida pelo ensaio, por espectrofotometria, da quantidade de glicosamina liberada (AIDOO *et al.*, 1981 ; LEKHA & LONSANE, 1994).

A hidrólise para despolimerização da quitina é realizada tanto na biomassa obtida quanto na matriz sólida, haja visto a extrema dificuldade de se separar o substrato sólido do micélio do fungo, após a fermentação. Todavia, os substratos sólidos utilizados como fonte de carbono em fermentação semi-sólida são, geralmente, resíduos agroindustriais e quando hidrolisados geram açúcares com estruturas químicas semelhantes a da glicosamina, interferindo no resultado obtido através do método colorimétrico, uma vez que este detecta não somente a glicosamina, mas todos os açúcares de seis carbonos presentes no meio (PENMAN *et al.*, 2000). Dessa forma, com

Quadro 2.2 – Exemplos de aplicações da fermentação semi-sólida

Produto	Microrganismo	Substrato Sólido	Referência
inulinase	<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	resíduo da raiz de chicória e farelo de trigo	VALADÃO, 2005
pectinase	<i>Moniliella</i> SB9 <i>Penicillium</i> sp EGC5	farelo de trigo, bagaços de laranja e cana-de-açúcar	MARTIN <i>et al.</i> , 2004
pectinase	<i>Thermoascus arantiacus</i>	farelo de trigo, bagaços de laranja e cana-de-açúcar	MARTINS <i>et al.</i> , 2002
pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	farelos de trigo e soja	CASTILHO <i>et al.</i> , 2000a
pectinase	<i>Bacillus</i> sp DT7	polpa de maçã, farelos de trigo e arroz	KASHIAP <i>et al.</i> , 2003
pectinase	<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	farelo de trigo, bagaço de laranja	SILVA <i>et al.</i> , 2005b
pectinase	<i>Aspergillus niger</i> M21	casca de limão	DANIEL <i>et al.</i> , 1996
pectinase	<i>Aspergillus niger</i> C28B25	borra de café	MINJARES-CARRANCO <i>et al.</i> , 1997
poligalacturonase	<i>Aspergillus oryzae</i> CCT3940	farelo de trigo	MALVESSI & SILVEIRA, 2004
poligalacturonase xilanase protease	<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	farelo de trigo casca de manga	COURI <i>et al.</i> , 2000
protease	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Penicillium pinophilum</i> <i>Penicillium aculeatum</i>	farelos de trigo e arroz, tortas de óleos de coco, gergelim e oliva	SANDHYA <i>et al.</i> , 2005
celulase hemicelulase	<i>Aspergillus niger</i> KK2	palha de arroz farelo de trigo	KANG <i>et al.</i> , 2004
celulase xilanase	<i>Bacillus</i> sp <i>Bacillus subtilis</i>	farelo de soja	HECK <i>et al.</i> , 2002
xilanase	<i>Aspergillus fisheri</i> Fxn1	farelo de trigo	SENTHILKUMAR <i>et al.</i> , 2005
amilase	<i>Aspergillus niger</i>	farelo de trigo	NANDAKUMAR <i>et al.</i> , 1999
penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	bagaço de cana-de-açúcar	DOMÍNGUEZ <i>et al.</i> , 2000
ácido giberélico	<i>Gibberella fujikoroii</i>	farelo de trigo	BANDELIER <i>et al.</i> , 1997
ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	bagaços de mandioca e cana-de-açúcar	VANDENBER <i>et al.</i> , 2000

o intuito de minimizar este possível erro de leitura proveniente da hidrólise do substrato, o mesmo procedimento para determinação de glicosamina é realizado no meio não inoculado e, ao final de cada leitura, esse valor é subtraído do resultado. Os resultados obtidos por muitos pesquisadores, apontam a glicosamina como um hábil indicador de crescimento microbiano, em fermentação semi-sólida.

DESGRANGES *et al.* (1991) avaliaram o teor de biomassa pela análise da glicosamina como constituinte celular. A análise foi efetuada em duas etapas: hidrólise e extração. Os dados mostraram que a glicosamina apresentou comportamento constante. SCOTTI *et al.* (2001) também concluíram que a medida da glicosamina é um método satisfatório para a estimativa da biomassa fúngica, no estudo do crescimento de *Cunninghamella elegans*, em fermentação semi-sólida. Os autores constataram que o conteúdo de glicosamina manteve-se constante, independentemente da idade da cultura e das condições de cultivo, mas pareceu ser dependente da composição do meio de cultivo, em função da natureza da fonte de carbono. GELMI *et al.* (2002) demonstram em seu trabalho experimental, a validade da dosagem de glicosamina como método indireto para a estimativa da biomassa microbiana de *Gibberella fujikoroii*, na produção de ácido giberélico, por fermentação semi-sólida. SANTOS (2001) e KALOGERIS *et al.* (2003) fizeram uso desta técnica para a determinação da biomassa de *Thermoascus aurantiacus* na produção de xilanases em cultivo semi-sólido. NEVES (2003) comparou a técnica de determinação da glicosamina com a técnica de processamento digital de imagem para monitorar o crescimento do fungo filamentosos *A. niger* 3T5B8, em fermentação semi-sólida, e foi verificada uma relação direta e linear entre ambas as metodologias utilizadas. Mais recentemente, VALADÃO (2005) também utilizou a medida da glicosamina como método indireto para determinação do crescimento de *A. niger* 3T5B8, cultivado em meio semi-sólido.

## 2.4 Biorreatores para Fermentação Semi-Sólida

Um biorreator é um recipiente que tem como objetivos: conter o leito de substrato, impedir a liberação do microrganismo para as vizinhanças do sistema, impedir a entrada de contaminantes no sistema e manter as condições ótimas para crescimento do microrganismo e formação de produto em seu interior de maneira uniforme, ao longo do processo.

Os biorreatores, nos processos fermentativos, devem criar um ambiente propício para o crescimento e a atividade dos microrganismos. Para isto, o biorreator deve ser projetado de forma a permitir o estreito contato entre o meio e o microrganismo, durante o cultivo. Um biorreator, para ser considerado ideal, deve ser construído com material atóxico, sendo capaz de suportar altas pressões, para o caso das esterilizações; possuir um sistema de agitação e/ou aeração, bem como permitir a retirada periódica de amostras, sem comprometer o processo; possuir um mecanismo de resfriamento, de forma a controlar a temperatura do ambiente de reação e, por fim, ser capaz de operar em condições assépticas (THIEMANN, 2001).

A escolha do reator adequado pode minimizar, ou até mesmo solucionar, vários problemas relativos à condução da fermentação em meio semi-sólido (DURAND *et al.*, 1993).

Existe uma grande diversidade de configurações para os reatores, em fermentação semi-sólida, em escala de laboratório, sendo mais comumente utilizados os reatores de bandeja, de leito fixo ou de coluna e de tambor rotativo (DURAND, 2003).

Projetar e operar biorreatores em escala industrial é um grande desafio de engenharia, devido às variações temporais e espaciais. As variáveis operacionais e de

projeto (sistemas de agitação, aeração e resfriamento, geometria do biorreator e adições ao biorreator) devem ser manipuladas, para que as condições sejam mantidas o mais próximo possível das condições ótimas de operação. Porém, no interior do sistema estão envolvidos fenômenos de transporte e fenômenos biológicos (cinética de crescimento), que causam desvios das condições ótimas e interagem entre si para determinar o desempenho do biorreator. A solução encontrada é a construção de modelos matemáticos que permitam que um biorreator em larga escala seja projetado e operado eficientemente, uma vez que durante o processo, só podem ser realizadas manipulações externas.

#### **2.4.1 Biorreatores de coluna**

Os reatores de coluna são bastante utilizados, em escala laboratorial, nos processos de fermentação semi-sólida. Sua utilização minimiza os problemas com os gradientes de temperatura, em função da convecção causada pelo ar que entra diretamente no reator e permite que o CO<sub>2</sub>, liberado durante as reações metabólicas, seja eliminado e substituído pelo ar utilizado na aeração do sistema. O controle da temperatura é feito pela imersão do reator em um banho termostatizado ou utilizando colunas encamisadas com circulação de líquido refrigerante (DURAND, 2003).

Por serem sistemas fechados, os reatores de coluna estão pouco propensos à contaminação por bactérias (GHILDYAL *et al.*, 1994).

Os reatores de coluna são conhecidos como “Sistema de Raimbault”. Este sistema é composto por pequenas colunas, que são preenchidas com o substrato semi-sólido previamente inoculado, e imersas em um banho termostático. Cada coluna recebe ar, geralmente saturado com água, em fluxo ascendente (DE ARAUJO *et al.*, 1997).

Uma vantagem da utilização deste tipo de biorreator é a facilidade da manutenção da temperatura do leito de fermentação ao longo do processo, uma vez que a remoção do calor pela parede da coluna é eficiente, devido à geometria da coluna e ao pequeno volume de substrato utilizado. Em contrapartida, a maior desvantagem está relacionada à retirada de amostras diretamente da coluna, ao longo da cinética, sendo necessária a amostragem destrutiva, retirando-se uma coluna, em cada intervalo de tempo determinado (DURAND, 2003).

#### **2.5 Fungos Filamentosos**

A denominação fungos filamentosos abrange os fungos formados por hifas, que formam um revestimento esbranquiçado ou colorido, sobre o substrato onde crescem. São descritas mais de 100.000 espécies, distribuídas em aproximadamente 3.000 gêneros. As células, ricas em exo e endoenzimas, são tubuliformes e formam hifas, que podem ser uni ou pluricelulares. Um emaranhado de hifas constituem o micélio. A parede celular destes filamentos é composta por quitina e hemicelulose (JÖRGENSEN, 1959).

Em sua pesquisa, BIESEBEKE *et al.* (2002) mostraram uma representação do crescimento dos fungos filamentosos em fermentação semi-sólida, onde é possível verificar dois tipos de hifas: as aéreas, que aparecem sobre a interface ar-líquido, e as penetrativas, que ficam em contato direto com o substrato.

A absorção de nutrientes pelos fungos filamentosos é favorecida pelo modo de adesão destes às partículas do substrato, durante o crescimento (CORDOVA-LOPEZ *et al.*, 1996). Nas fermentações semi-sólidas o crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento

determinadas pela disponibilidade dos nutrientes e pelas características do substrato (LONSANE *et al.*, 1985).

A maioria dos processos em meio semi-sólido são conduzidos por fungos filamentosos, sendo mais comumente utilizados os Phicomycetos (*Mucor e Rhizopus*), Ascomicetos (*Aspergillus e Penicillium*) e Basidiomicetos (fungos da podridão branca) (PANDEY *et al.*, 2000a).

A facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e a capacidade destes em produzir esporos, o que facilita o preparo do inóculo e a estocagem das células, na forma vegetativa, por longos períodos de tempo, são características que fazem com que os fungos filamentosos sejam mais atrativos para utilização na fermentação semi-sólida (MITCHELL *et al.*, 2000).

### **2.5.1 *Aspergillus niger***

Os fungos são considerados os melhores produtores enzimáticos, sendo a espécie *A. niger* a mais utilizada na produção industrial de enzimas pectinolíticas (NAIDU & PANDA, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2000; DE GREGORIO *et al.*, 2002). Tanto a técnica de fermentação submersa quanto a técnica de fermentação semi-sólida podem ser usadas na produção de pectinases por *A. niger* (LOERA *et al.*, 1999).

Esta espécie é especialmente conhecida como produtora de enzimas despolimerizantes. Segundo WHITAKER (1984), já foram detectadas mais de 64 enzimas deste tipo produzidas por *A. niger*, crescendo em condições variadas. Um aspecto positivo do emprego desta espécie é a inexistência de restrições ao uso de enzimas dela derivadas na indústria de alimentos (CASTILHO *et al.*, 1996).

Alguns gêneros de fungos, como *Aspergillus*, formam um micélio permanente peculiar, o esclerócio. O corte transversal de um esclerócio apresenta um revestimento externo de coloração escura, formado por células angulares de paredes espessas, e um revestimento interno de tecido entrelaçado de hifas. Os esclerócios contêm nutrientes de reserva e também são responsáveis pela reprodução assexuada (JÖRGENSEN, 1959).

As formas mutantes desta espécie também são bastante utilizadas, já que o rendimento de um processo enzimático produtivo pode ser melhorado através da seleção de mutantes que sejam mais resistentes à repressão catabólica e que sintetizem maiores quantidades de enzima sem a presença de um indutor (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Microrganismo

O agente de fermentação foi uma linhagem mutante do fungo filamentosso *Aspergillus niger* 3T5B8 da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Essa linhagem foi obtida por mutação e seleção em trabalhos anteriores de melhoramento genético a partir de uma linhagem selvagem, isolada de pimenta-do-reino (COURI & FARIAS, 1995).

### 3.2 Manutenção e Ativação do Microrganismo

Conídios do microrganismo armazenados em solo estéril e sob condições de congelamento (-18°C), foram reativados em duas etapas: na primeira etapa realizou-se a transferência dos conídios do solo para a gelose inclinada do meio básico, rico em sais e pectina cítrica, e a segunda etapa consistiu no repique do microrganismo para novo cultivo, transferindo-se conídios da gelose da primeira etapa para nova gelose inclinada, também contendo o meio básico.

Os tubos de ensaio contendo a gelose inclinada do meio básico foram incubados em estufa BOD mod. 347F por 7 dias a 32°C, visando o perfeito crescimento do fungo.

Os conídios da segunda etapa de ativação foram utilizados para a inoculação do meio de sabugo de milho.

### 3.3 Inoculação do Meio de Sabugo de Milho

Os conídios foram transferidos para 20 mL de uma solução estéril de Tween 80 0,3% p/v. Utilizou-se 1 mL da suspensão de conídios para a inoculação de 4,6 g do meio de sabugo de milho. Este substrato, devido à sua granulometria, aumenta a superfície de contato, proporcionando maior esporulação.

Os meios de sabugo de milho inoculados foram incubados em estufa BOD mod. 347F por 5 dias a 32°C. Durante o período de incubação foram observados aspectos de coloração, formação de micélio aéreo, esporulação e presença de contaminantes. Posteriormente, os frascos foram armazenados sob refrigeração a 4°C. Mediante qualquer alteração observada, o frasco era esterilizado e descartado.

### 3.4 Meios de Cultivo

#### 3.4.1 Meio básico - manutenção

O meio básico foi desenvolvido no Laboratório de Processos Fermentativos do CTAA, durante a seleção de linhagens de microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas. Sua composição é descrita na Tabela 3.1.

Por ser de difícil solubilização, a pectina foi previamente dissolvida em água destilada, com o auxílio de agitador magnético, e os sais foram adicionados em seguida. Antes da adição do agar, o pH do meio foi ajustado em 4,5 com soluções de NaOH 1M e HCl 0,1M. O volume foi ajustado e o meio conduzido para cozimento do agar, em banho-maria. Em seguida, verteu-se cuidadosamente o meio em tubos de ensaio que foram devidamente tampados com rolhas de algodão cardado e esterilizados em



autoclave a 1 atm por 15 minutos. Após esterilização os tubos foram imediatamente inclinados para a formação da superfície inclinada.

**Tabela 3.1** – Composição do meio básico

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	3,00
MgSO <sub>4</sub>	0,50
KCl	0,50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00
Ágar-agar	30,00
Pectina cítrica	10,00

### 3.4.2 Meio de sabugo de milho – produção de conídios

No preparo deste meio (GOMES, 1995), para cada frasco Erlenmeyer de 125 mL, utilizou-se 4,6 g de sabugo de milho (seco, triturado e peneirado para remoção das partículas de menor granulometria e obtenção de fragmentos com tamanho mais homogêneo) enriquecido com 6 mL da solução C. (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** – Soluções para preparo do meio de sabugo de milho

<b>Solução A:</b>	
KHPO <sub>4</sub>	20 g
H <sub>2</sub> O destilada	100,0 mL
<b>Solução B:</b>	
ZnSO <sub>4</sub>	3,96 g
FeSO <sub>4</sub>	4,60 g
MnSO <sub>4</sub>	0,01 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95-97%)	0,5 mL
H <sub>2</sub> O destilada	100,0 mL
<b>Solução C:</b>	
Peptona	2,80 g
HCl 2N	1 gota
Solução A	0,19 mL
Solução B	0,025 mL
H <sub>2</sub> O destilada	50,0 mL

Os frascos foram devidamente homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, tampados com rolha de algodão cardado e esterilizados a 1 atm por 1 hora.

### 3.4.3 Meio de fermentação

Os meios de fermentação foram compostos basicamente por farelo de trigo e resíduo do processamento do suco de maracujá (*Passiflora edulis*), enriquecidos com solução nutriente de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que é utilizada como fonte de nitrogênio e também

permite ajustar a umidade do meio de modo a proporcionar uma atividade aquosa satisfatória para o desenvolvimento do fungo.

O farelo de trigo, que vem sendo usado rotineiramente no laboratório de Processos Fermentativos do CTAA como matéria-prima para fermentação em meio semi-sólido, foi cedido pela empresa Moinho Cruzeiro e descrito por GOMES (1995).

O resíduo de maracujá (casca, albedo e sementes), cedido pela empresa Hortigil Hortifruti S.A., foi processado (Processador Skymesen modelo PAIE) e conduzido à secagem em estufa com aeração a 55°C até atingir aproximadamente 10% de umidade. Posteriormente, foi submetido à moagem realizada em moinho de facas. A composição centesimal do resíduo de maracujá foi determinada segundo normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976) e a pectina total foi quantificada através do método proposto por McCREADY & McCOMB (1952), trata-se de um método colorimétrico que dosa unidades de ácido D-galacturônico, fazendo-o reagir com solução 0,025M de tetraborato de sódio em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a quente, formando o 5-carboxi-2-formil-furano que em presença de carbazol forma um cromóforo róseo, cuja absorção é medida a 530 nm.

Ambas as matérias-primas foram peneiradas visando o ajuste granulométrico, de modo a se obter partículas com diâmetros inferiores a 3 mm, proporcionando um meio mais homogêneo para o crescimento do microrganismo.

O monitoramento da cinética do fungo foi realizado em meios de cultura otimizados, constituídos por farelo de trigo enriquecido com 33,25% de resíduo de maracujá e umidificados a 62,5% com solução 0,43% de uréia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) e 0,30% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em HCl 0,1M. Os meios foram preparados em frascos erlenmeyer de 250 mL, onde a solução de uréia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em HCl 0,1M foi adicionada ao farelo de trigo e ao resíduo de maracujá, homogeneizando-se com bastão de vidro. Os frascos, devidamente tampados com rolhas de algodão cardado, foram esterilizados a 120°C por 15 minutos e a pressão mantida a 0,5 atm para evitar a caramelização do meio de cultura.

A composição do meio de fermentação é apresentada na Tabela 3.3

**Tabela 3.3 – Composição do meio de fermentação**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Resíduo de maracujá	4,1 g
Farelo de trigo	8,2 g
Solução de uréia 0,43% e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,30% em HCl 0,1M	7,7 mL

### **3.5 Preparação do Inóculo para Fermentação Semi-Sólida**

A cada frasco com meio de sabugo de milho foram adicionados 20 mL de solução estéril de Tween 80 0,3% p/v. Com o auxílio de um bastão de vidro, foi realizada a agitação manual dos frascos para promover a liberação dos conídios. Em seguida, a suspensão foi filtrada com gaze esterilizada e transferida para recipiente também estéril.

A concentração de conídios necessária para a inoculação foi determinada em câmara de Neubauer após a devida diluição da densa suspensão obtida. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando uma concentração final de 10<sup>7</sup> conídios/g de meio.

### **3.6 Fermentação em Meio Semi-Sólido**

Após inoculação, o meio de fermentação foi transferido para o interior das

colunas em condições assépticas. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar Nuair mod. NU 425-200.

Os experimentos foram conduzidos em colunas cilíndricas de vidro (21,0cm x 2,2cm) contendo, aproximadamente, 14 g de meio de fermentação esterilizado. A temperatura foi mantida a 32°C pela imersão das colunas em banho termostático com circulação (Marconi). A unidade de fermentação utilizada para realização do processo permitiu variar e controlar a aeração do meio.

A unidade experimental utilizada no processo de fermentação semi-sólida é demonstrada na Figura 3.1.



**Figura 3.1** – Unidade experimental utilizada para a fermentação semi-sólida

### 3.7 Planejamento Experimental

Em processos fermentativos, onde cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis, é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais.

Os experimentos de fermentação em meio semi-sólido foram realizados, conforme planejamento fatorial completo  $3^2$ , em um período estabelecido de 48 horas.

O planejamento experimental foi realizado com o intuito de se estabelecer as condições mais adequadas à síntese da enzima pelo microrganismo, em meio semi-sólido, tendo como matérias-primas resíduo de maracujá e farelo de trigo.

#### 3.7.1 Efeito da concentração das fontes de carbono e nitrogênio na síntese enzimática

Esta etapa visou estabelecer a melhor proporção entre o resíduo de maracujá e o farelo de trigo e a melhor concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em HCl 0,1M para a produção da enzima poligalacturonase.

Foram mantidas a umidade inicial do meio de fermentação em 60% e a aeração em 1 vvm. O resíduo de maracujá foi adicionado ao farelo de trigo nas proporções de 0%, 25% e 50%, enquanto a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em HCL 0,1M variou em 0,6%, 0,9% e 1,2%.

### **3.7.2 Efeito da aeração e da umidade inicial do meio de fermentação na síntese enzimática**

Nesta etapa variou-se a aeração em 0,5 vvm, 1,0 vvm e 1,5 vvm, por meio de ar atmosférico. A umidade inicial do meio, que variou em 40%, 60% e 80%, foi aferida pela adição de diferentes volumes da solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em HCl 0,1M.

As concentrações de resíduo de maracujá, de farelo de trigo e da solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em HCl 0,1M foram estabelecidas na etapa anterior.

### **3.7.3 Efeito das fontes de nitrogênio e da concentração da fonte de fósforo na síntese enzimática**

Nesta última etapa mantiveram-se fixos a aeração, a umidade inicial do meio de fermentação e as concentrações de farelo de trigo e resíduo de maracujá, estabelecidos anteriormente.

Foram testadas três fontes de nitrogênio:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ . A concentração de nitrogênio disponível, em cada fonte, foi mantida em 0,077% em relação ao meio, conforme estabelecido nas etapas experimentais anteriores. Variou-se a concentração da fonte de fósforo pela adição de solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em HCl 0,1M, nas concentrações 0%, 0,3% e 0,6%.

### **3.7.4 Cinética da fermentação**

Tendo em vista as condições estabelecidas nas fermentações preliminares, realizadas de acordo com o planejamento experimental, foi acompanhada a cinética de produção enzimática por um período de 96 horas a 32°C, sendo realizadas amostragens nos tempos 0, 16, 24, 40, 48, 64, 72, 88 e 96 horas.

As amostras foram analisadas determinando-se as atividades de poligalacturonase, protease, pectinesterase, pectinoliase e xilanase. Foram determinados também o crescimento da biomassa e a umidade do meio de fermentação durante a cinética fermentativa.

## **3.8 Recuperação do Extrato Enzimático**

Transferiu-se o meio fermentado para becher de 100 mL e o complexo enzimático foi extraído pela adição de tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 na proporção de 35 mL de solução tampão por 14 g de meio fermentado.

Os becheres foram incubados a 32°C em banho termostático (Reciprocal Shaking Bath mod. 50) por um período de 1 hora, sob agitação de 120 rpm.

O resíduo da fermentação foi separado do extrato enzimático por filtração a vácuo através de filtro Whatman nº41. Para a remoção de conídios que não ficaram retidos na primeira filtração, realizou-se outra filtração através de filtro Millipore de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , obtendo-se um extrato enzimático isento de conídios.

Os extratos enzimáticos obtidos foram armazenados em tubos rosqueados a -18°C até serem utilizados para as análises de atividade enzimática.

## **3.9 Determinações Quantitativas**

No processo fermentativo, o microrganismo não produz somente uma enzima e sim um extrato constituído por várias enzimas. Este trabalho visou, principalmente, a

produção da enzima poligalacturonase. Todavia, também foram determinadas as atividades de pectinoliase, pectinesterase, protease e xilanase, bem como, o teor de biomassa e a umidade, durante o acompanhamento da cinética fermentativa.

Exceto para umidade, todas as determinações desse item foram realizadas em duplicata.

### **3.9.1 Determinação da atividade de poligalacturonase**

A determinação da atividade da enzima poligalacturonase baseia-se na quantificação dos grupos redutores resultantes da hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1, 4 do ácido poligalacturônico (COURI, 1993).

A mistura da reação consistiu de 4,0 mL de solução 0,25% de ácido poligalacturônico (Sigma) em tampão acetato de sódio 0,2M de pH 4,5, previamente termostaticado por 10 minutos na temperatura de reação e uma alíquota de 0,1 mL do extrato enzimático, obtido conforme descrito anteriormente (item 3.8).

A mistura reacional foi incubada a 35°C por 30 minutos em banho termostático Fisher mod. 9500 e, em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo de Folin-wu contendo 1,0 mL da mistura A+B de Somogyi e 0,9 mL de água destilada, seguindo-se o procedimento de Somogyi (SOMOGYI, 1952) para a determinação dos grupos redutores.

No preparo do branco, a mistura A+B de Somogyi foi adicionada no meio reacional imediatamente após a adição do extrato enzimático para paralisar a reação.

A absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrometer lambda 10.

A atividade enzimática foi expressa em U/mL, onde uma unidade de poligalacturonase equivale a 1  $\mu$ mol de ácido galacturônico liberado por minuto nas condições de reação (COURI, 1993).

A curva padrão para este método foi construída usando-se uma solução de ácido D-galacturônico (Merck), numa faixa de concentração de 20 a 200 mg/L e em seguida o procedimento do método de Somogyi.

### **3.9.2 Determinação da atividade de protease**

Para determinação da atividade das enzimas proteolíticas foi utilizado o método descrito por CHARNEY & TOMARELLI (1947), o qual baseia-se na formação de derivados corados em meio alcalino, a partir da digestão de uma solução de azoproteína.

A mistura reacional consistiu de 1,0 mL de uma solução 0,5% de azocaseína em tampão acetato de sódio 50 mM de pH 5,0, aclimatado por 10 minutos na temperatura da reação e 1,0 mL do extrato enzimático, obtido conforme o item 3.8, previamente diluído de 1:5. A mistura foi incubada por 40 minutos a 37°C em um banho termostático Fisher mod. 9500. Após o tempo de reação, adicionou-se 1,0 mL de uma solução de ácido tricloroacético a 10%, visando a precipitação do substrato não digerido pelas enzimas proteolíticas. Em seguida, as amostras foram conduzidas à centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos em centrífuga Fanen mod. 215. Transferiu-se 2,0 mL do sobrenadante para tubo de ensaio contendo 2,0 mL de KOH 5N.

Para cada amostra foi feito um branco utilizando-se extrato enzimático inativado em banho-maria a 100°C por 20 minutos.

A atividade enzimática foi expressa pela diferença de absorbância entre os ensaios com preparados enzimáticos e os seus respectivos brancos, medida a 428 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrometer lambda 10. Uma unidade de atividade

enzimática foi definida pelo aumento de 0,01 da absorbância da amostra em relação ao seu branco, por minuto de reação em pH 5,0 a 37°C, por mL de extrato enzimático.

### **3.9.3 Determinação da atividade de pectinoliase**

A atividade da enzima pectinoliase foi determinada seguindo-se a metodologia proposta por ZETELAKI & HARVÁTH (1982), tendo como substrato uma solução 0,5% de pectina de maçã (Sigma) em tampão acetato de sódio 0,2M de pH 5,5.

O meio reacional consistiu de 2,5 mL da solução 0,5% de pectina de maçã, 0,5 mL de cloreto de cálcio e 21,0 mL de tampão acetato de sódio de pH 5,5, aclimatados por 10 minutos na temperatura da reação antes da adição de 1,0 mL do extrato enzimático, previamente diluído de 1:5.

A mistura reacional foi incubada a 35°C por 15 minutos em banho termostático Fisher mod. 9500, sendo a leitura da absorbância feita em espectrofotômetro Spectronic 21D, a 235nm.

Para cada amostra foi feito um branco com o preparado enzimático inativo em banho-maria a 100°C por 20 minutos, seguindo o mesmo procedimento descrito acima para a mistura reacional.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1  $\mu$ mol de 4,5 glicosídeo uronato produzido por mL de extrato enzimático por minuto de reação em pH 5,5 a 35°C.

### **3.9.4 Determinação da atividade de pectinesterase**

A atividade da enzima pectinesterase foi determinada pela presença do metanol liberado na reação de desesterificação do ácido poligalacturônico, pela titulação do ácido carboxílico, uma vez que este encontra-se em equilíbrio estequiométrico com o metanol, seguindo-se a metodologia proposta por KHANNA *et al.* (1981), com modificações.

A mistura de reação consistiu de 4,0 mL de uma solução 0,5% de pectina de maçã (Sigma) em tampão acetato de sódio de pH 5,0, aclimatada por 10 minutos na temperatura da reação e 1,0 mL do extrato enzimático.

O meio reacional foi incubado a 35°C por 30 minutos em banho termostático Fisher mod. 9500. Transcorrido este tempo, a reação foi paralisada em banho-maria a 100°C por 3 minutos. Posteriormente, adicionou-se a cada meio 20,0 mL de água MilliQ, objetivando aumentar o volume do meio reacional, favorecendo a titulação, realizada em titulador 794 Basic Titrino - Metrohm, utilizando como titulante NaOH 0,05N e como indicador, fenolftaleína.

Para cada amostra foi feito um branco, que utilizou a enzima inativada por aquecimento em banho-maria a 100°C por 20 minutos.

A unidade da enzima pectinesterase foi definida como 1  $\mu$ mol de metanol liberado por minuto nas condições de ensaio padrão.

### **3.9.5 Determinação da atividade de xilanase**

A atividade da enzima xilanase foi determinada através da dosagem do número de grupos redutores formados por minuto de reação, seguindo a metodologia descrita por GOMES *et al.* (1992).

A mistura reacional consistiu de 0,5 mL de uma solução 0,25% de xilana (Sigma) em tampão acetato de sódio 0,2M de pH 5,2, aclimatada por 10 minutos na

temperatura da reação e 0,5 mL do complexo enzimático, previamente diluído de 1:5.

A reação processou-se em tubos de Folin-wu incubados a 60°C por 10 minutos em banho termostático Fisher mod. 9500. Após o tempo de reação, adicionou-se ao meio 1,0 mL da mistura A+B de Somogyi, dando seqüência ao procedimento de Somogyi para a determinação dos grupos redutores. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Spectronic 21D a 540 nm (SOMOGYI, 1952).

Para cada amostra foi feito um branco, seguindo-se o mesmo procedimento anterior, sendo que a solução A+B de Somogyi foi adicionada imediatamente após a adição do complexo enzimático, para paralisar a reação.

A curva padrão para este método foi construída usando-se uma solução de xilose (Vetec) numa faixa de concentração de 20 a 200 mg/L e, em seguida, o procedimento do método de Somogyi.

Uma unidade enzimática corresponde a 1 µmol de xilose liberado por minuto, nas condições de reação utilizadas.

### 3.9.6 Quantificação celular

Para determinação do crescimento da biomassa, baseado no teor de glicosamina, foi utilizado o método proposto por BLIX (1948) e SAKURAI *et al.* (1997).

Em tubo de ensaio com tampa de rosca pesou-se 0,5 g do meio fermentado previamente seco por 24 horas em estufa a 100°C, para a extração da glicosamina contida nesta amostra e, em seguida, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 70%, visando a digestão ácida dos componentes do micélio do fungo. Paralelamente, foi determinada a umidade da amostra.

Após 24 horas, foi adicionado em cada tubo de ensaio 5,0 mL de água destilada e este produto foi esterilizado por 1 hora a 1 atm. O material foi posteriormente filtrado quantitativamente e neutralizado com soluções de NaOH 5M e HCl 1M, sendo avolumado a 100,0 mL.

Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL da amostra neutralizada e adicionou-se 1,0 mL de solução de acetilacetona (Tabela 3.4), colocando a mistura em banho-maria a 96°C por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente, sendo adicionados a ela 5,0 mL de etanol e, imediatamente, 1,0 mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído (Tabela 3.4), seguido de agitação até completa dissolução, adicionando-se mais 5,0 mL de etanol.

**Tabela 3.4** – Preparo das soluções de acetilacetona e p-dimetilaminobenzaldeído

<b>Solução de acetilacetona</b>	0,75 mL de acetilacetona em balão volumétrico de 25 mL e avolumado com solução de carbonato de sódio a 1,25N
<b>Solução de p-dimetilaminobenzaldeído</b>	3,2 g de p-dimetilaminobenzaldeído em 20 mL de etanol p.a. e 20 mL de ácido clorídrico p.a.

Após 45 minutos de reação, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro Spectronic 21D, em comprimento de onda de 530 nm.

A curva padrão para esse método foi realizada utilizando-se diluições (1 a 10 mg/L) de uma solução padrão de 100mg/L de glicosamina p.a. (Sigma). Uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi submetida ao procedimento da reação.

Para evitar quaisquer erros na determinação da glicosamina devido a possíveis falsos resultados provenientes da hidrólise ácida utilizada, o teor de glicosamina no meio de cultivo não inoculado (branco) foi medido e o valor encontrado foi descontado dos encontrados nas amostras avaliadas.

### 3.9.7 Determinação da umidade

As amostras foram submetidas a pesagem exata e a secagem sob temperatura de 100°C por um período de 24 horas, sendo posteriormente submetidas a nova pesagem (NERY, 1996).

A umidade estabeleceu a razão entre a diferença dos valores final e inicial pelo valor inicial da amostra, multiplicando esta por 100, afim de se expressar um valor percentual da mesma.

### 3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos experimentalmente das fermentações em meio semi-sólido foram analisados estatisticamente com o uso do programa computacional STATISTICA for Windows versão 6.0.

Foi necessário realizar a codificação das variáveis, distribuindo-as nos diferentes níveis do planejamento experimental (Tabela 3.5).

Para avaliação da concentração da fonte de fósforo e determinação da fonte de nitrogênio mais adequada ao meio, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. A comparação entre as médias foi feita pelo Teste de Tukey.

**Tabela 3.5** – Codificação e distribuição das variáveis nos diferentes níveis do planejamento

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Proporções de resíduo de maracujá em farelo de trigo (%)	0	25	50
Concentração de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em HCL 0,1M (%)	0,6	0,9	1,2
Aeração (vvm)	0,5	1,0	1,5
Umidade inicial do meio (%)	40	60	80



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da Matéria-Prima

Para caracterização das matérias-primas utilizadas nos experimentos, determinou-se a composição centesimal do resíduo de maracujá (casca, albedo e sementes), previamente seco a 55°C e processado em moinho de facas para se obter partículas de tamanho homogêneo e propício ao desenvolvimento do microrganismo, uma vez que, o tamanho das partículas no meio de fermentação, interfere no processo fermentativo, afetando a troca de gás e calor dentro do sistema (SILVA *et al.*, 2002).

A Tabela 4.1 apresenta a composição centesimal das matérias-primas utilizadas nos experimentos.

**Tabela 4.1** – Composição centesimal das matérias-primas (g/100g)

Substrato	Umidade	Proteína	Extrato etéreo	Cinzas	Fibra Bruta	Carboidratos
Farelo de trigo	14,28	12,71	3,70	5,56	12,05	51,70
Resíduo de maracujá	10,32	6,93	0,62	6,42	28,88	46,83

O teor de pectina no resíduo de maracujá, utilizado nos experimentos, foi de 17,05 g/100g, que corresponde a 59% de fibra solúvel. O teor de fibras do resíduo de maracujá foi praticamente o dobro do encontrado no farelo de trigo, sugerindo a potencialidade do resíduo de maracujá para ser empregado tanto como substrato quanto como indutor, na produção de pectinase.

Na produção de enzimas pécticas, os indutores podem ser: poligalacturonídeos, ácido galacturônico, pectinas ou outras substâncias pécticas (GENARI *et al.*, 1996 *apud* PICCOLI-VALLE *et al.*, 2001). E esses indutores, muitas vezes apresentam custo elevado. De acordo com SILVA *et al.* (2002), o meio ideal para a produção de poligalacturonase é o que contém materiais pécticos como indutor.

A concentração de proteína no resíduo de maracujá é menor em relação à encontrada no farelo de trigo (Tabela 4.1). Se este resíduo for utilizado isoladamente como substrato, uma fonte complementar de nitrogênio deverá ser adicionada. Os teores de umidade, cinzas e carboidratos foram similares em ambos os resíduos utilizados.

FERRARI *et al.* (2004) realizaram a composição centesimal do resíduo de maracujá desengordurado, seco a 50°C e moído para obtenção do farelo. A umidade do resíduo e o teor de lipídeos (10,53% e 0,68%, respectivamente) apresentaram porcentagens semelhantes às obtidas no farelo de maracujá utilizado nos experimentos, enquanto os níveis de proteínas (15,62%), cinzas (1,8%), carboidratos (12,39%) e, principalmente, de fibras (58,98%) foram bastante distintos. Possivelmente, a diferença esteja atribuída à constituição do resíduo, uma vez que o farelo estudado por FERRARI *et al.* (2004) era constituído apenas por sementes de maracujá, enquanto o farelo utilizado nos experimentos, era constituído por sementes, albedo e casca de maracujá.

## 4.2 Efeito da Concentração das Fontes de Nitrogênio e Carbono na Síntese Enzimática

O potencial de síntese de uma enzima de um microrganismo pode ser afluído se as condições de processo forem adequadas. Nestes experimentos, foi estudada a influência das concentrações das fontes de nitrogênio e de carbono na produção da enzima poligalacturonase.

Foram testadas as diferentes composições do meio de fermentação variando-se a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , utilizado como fonte de nitrogênio, e a relação entre o resíduo de maracujá e o farelo de trigo que tem sido considerado a principal fonte de carbono do meio, conforme planejamento experimental (item 3.7.1).

A produção de protease também foi investigada, visto que, a presença desta enzima no extrato enzimático pode causar a hidrólise da poligalacturonase, reduzindo a produção da mesma.

Os resultados médios das atividades das enzimas poligalacturonase e protease, bem como a umidade final do meio, após 48 horas de fermentação, são apresentados na Tabela 4.2.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4.2, pode-se observar que a relação 25:75 entre resíduo de maracujá e farelo de trigo e a utilização de 0,9% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , levou à obtenção da mais alta atividade poligalacturonase (9,96 U/mL), dentro do intervalo avaliado. Verificou-se também que, nessas condições, houve um aumento de 72,6% da atividade poligalacturonase, em relação ao meio composto apenas por farelo de trigo, com concentração 0,6% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Este resultado deixa evidente a influência da composição do meio e da concentração da fonte de nitrogênio, na eficiência do processo.

**Tabela 4.2** – Atividades poligalacturonase e protease e umidade final do meio, tendo como variáveis a proporção de resíduo de maracujá (CM) em farelo de trigo (CT) e a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (CS)

Condições		Resultados *		
CM:CT (%)	CS (%)	Poligalacturonase (U/mL)	Protease (U/mL)	Umidade Final (%)
0:100	0,6	5,77	4,21	40
0:100	0,9	8,57	3,67	44
0:100	1,2	6,43	3,75	38
25:75	0,6	8,40	3,43	41
25:75	0,9	9,96	3,13	41
25:75	1,2	9,41	3,86	40
50:50	0,6	8,51	2,30	38
50:50	0,9	9,04	2,11	39
50:50	1,2	8,80	2,95	41

\* Os resultados consistem na média de 2 experimentos e o erro foi menor que 5%.

As atividades poligalacturonase obtidas mostraram-se satisfatórias quando comparadas à apresentada por SILVA *et al.* (1996), tendo como agente de fermentação a linhagem *A. niger* mutante M21, empregando apenas resíduo de maracujá como matéria-prima para a fermentação semi-sólida e 0,9% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio. Nestas condições, os autores alcançaram maior atividade de poligalacturonase (0,7 U/mL) em um período de fermentação de 100 horas. Entretanto,

ao utilizarem farelos de trigo e de soja, isolada ou conjuntamente, como matéria-prima, os autores verificaram que atividades poligalacturonásicas superiores a 35 U/mL foram obtidas para tempos de fermentação entre 22 e 45 horas.

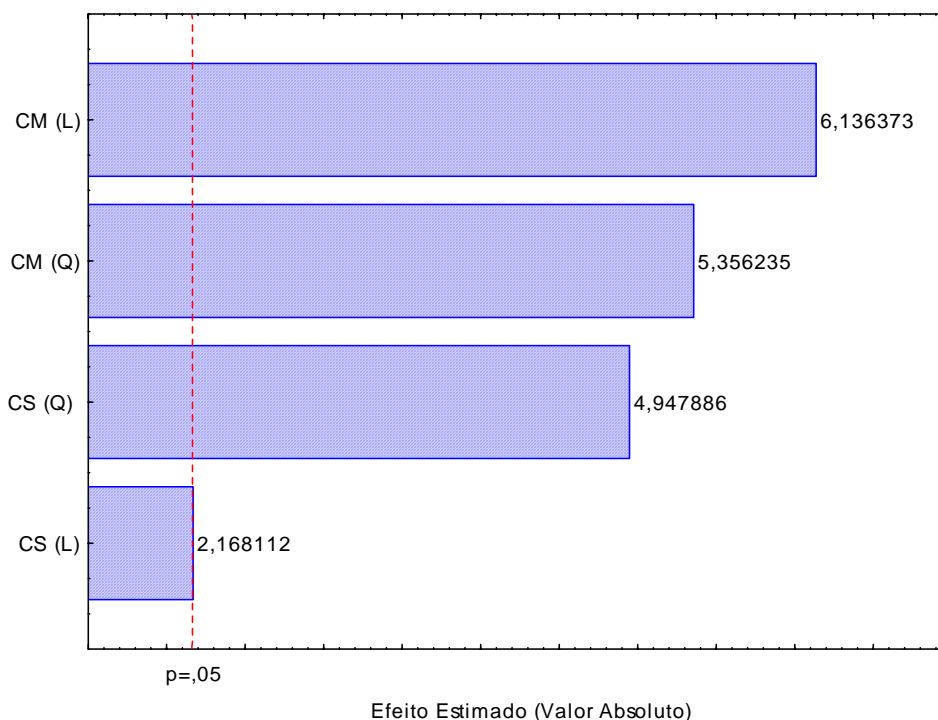
CASTILHO *et al.* (1996) avaliaram a produção de pectinases, utilizando a mesma fonte de nitrogênio, também na concentração de 0,9%, em fermentação semi-sólida com a linhagem *A. niger* mutante M26, tendo como substratos sólidos farelos de trigo e de soja, na proporção 1:1 e obtiveram o extrato enzimático mais concentrado (2,87 U/mL) em 64 horas de fermentação a 35°C.

É importante ressaltar que, a comparação de dados entre diferentes processos deve ser feita levando-se em consideração que, nos cultivos em meio sólido, a obtenção de diferentes níveis de eficiência, em relação a formação do produto desejado, depende, no conjunto de fatores que influenciam os cultivos em estado sólido, do substrato e da espécie microbiana utilizados, dentre outros (umidade, aeração, temperatura).

No presente trabalho, os resultados obtidos indicaram que em todas as condições testadas os valores da umidade final do meio de fermentação foram semelhantes (Tabela 4.2).

A diminuição da atividade protease, com o aumento da concentração de resíduo de maracujá (Tabela 4.2), pode ser um indicativo de que este resíduo agiu como inibidor da síntese desta enzima.

As análises estatísticas para os dados referentes à atividade poligalacturonase foram feitas utilizando-se o programa computacional STATISTICA for Windows Versão 6.0 e verificou-se, inicialmente, que a interação entre os fatores não foi significativa. Após a retirada do termo de interação, verificou-se que os termos quadráticos e lineares foram significativos, conforme observado no gráfico de Pareto (Figura 4.1). O nível de significância utilizado nestas análises estatísticas foi de  $p = 0,05$ .



**Figura 4.1** – Efeito das concentrações de resíduo de maracujá (CM) e sulfato de amônio (CS) sobre a atividade de poligalacturonase

A partir dos coeficientes de regressão ajustados, foi construído o modelo estatístico que relaciona PG com os fatores CM e CS (variáveis codificadas), conforme observado na Equação 1:

$$PG = 10,123 + 0,927CM - 1,404CM^2 + 0,328CS - 1,297CS^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

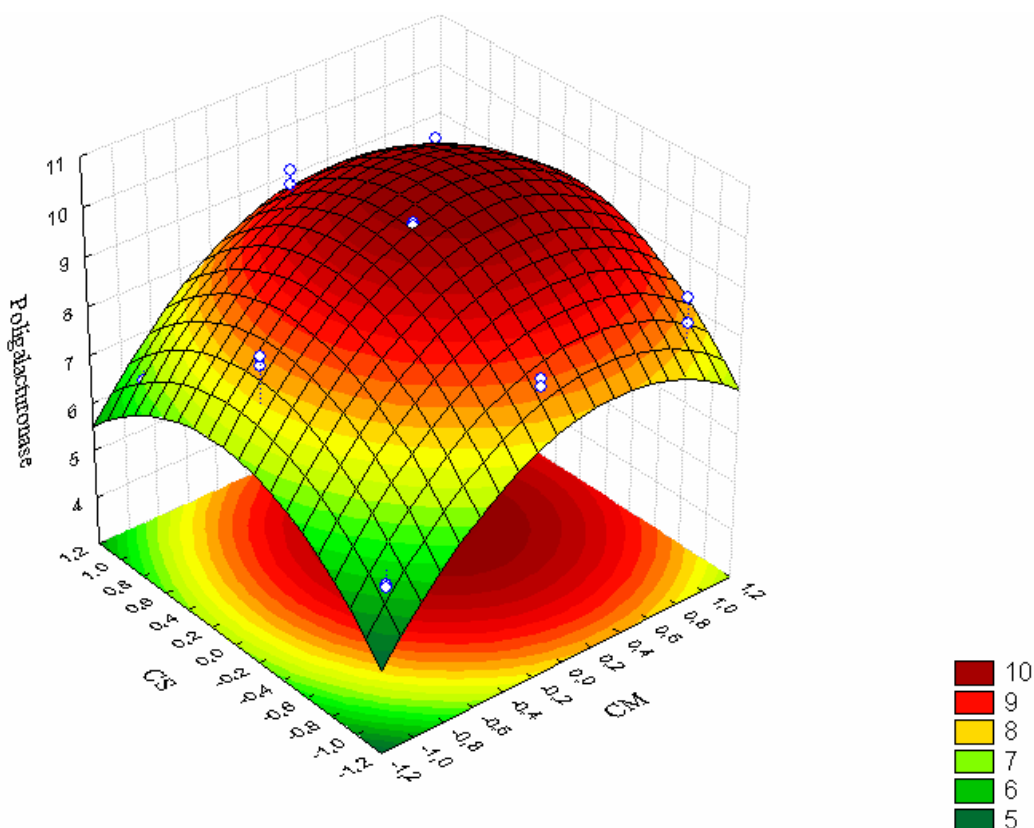
Onde:

CM = concentração (%) do resíduo de maracujá (codificado no item 3.9)

CS = concentração (%) de sulfato de amônio (codificado no item 3.9)

PG = atividade poligalacturonase (U/mL)

A Figura 4.2 mostrou o efeito das concentrações de resíduo de maracujá e de sulfato de amônio sobre a atividade poligalacturonase. A partir do modelo ajustado foi possível determinar as condições ótimas de CM (33,25%) e CS (0,94%) para produção de poligalacturonase, que passaram a ser utilizadas em experimentos posteriores. Nestas condições, a atividade poligalacturonase prevista pelo modelo é de 10,22 U/mL.



**Figura 4.2** – Superfície de resposta da atividade de poligalacturonase em função dos valores codificados de concentrações de resíduo de maracujá (CM) e sulfato de amônio (CS).

### 4.3 Efeito da Aeração e da Umidade Inicial do Meio na Síntese Enzimática

Neta etapa foram avaliadas as condições de operação dos reatores de coluna em termos de nível de aeração e umidade inicial do meio, conforme planejamento experimental (item 3.7.2).

A Tabela 4.3 mostra os valores médios das atividades das enzimas poligalacturonase e protease e da umidade final do meio em função das diferentes condições de aeração e umidade inicial, encontrados após 48 horas de fermentação.

**Tabela 4.3** – Atividades de poligalacturonase e protease e umidade final do meio, tendo como variáveis a aeração e a umidade inicial do meio

Condições		Resultados*		
Aeração (vvm)	Umidade Inicial (%)	Poligalacturonase (U/mL)	Protease (U/mL)	Umidade Final (%)
0,5	40	10,25	3,31	29
0,5	60	10,70	4,58	47
0,5	80	10,19	4,82	49
1,0	40	8,63	1,75	28
1,0	60	10,00	3,51	36
1,0	80	9,67	4,36	43
1,5	40	8,98	1,46	26
1,5	60	9,37	2,16	37
1,5	80	8,87	2,67	43

\* Os resultados consistem na média de 2 experimentos com um erro menor que 5%.

Os maiores valores de atividade poligalacturonase (~10U/mL) foram obtidos na condição de menor aeração, com fluxo 0,5vvm, independentemente da umidade inicial, em 48h de fermentação. Verificou-se uma ligeira diminuição na atividade poligalacturonase ao serem utilizadas umidades iniciais de 40 e 80% .

Na fermentação em meio semi-sólido o teor de umidade pode influenciar o estado físico do substrato, a disponibilidade e a difusão de nutrientes e a troca de nitrogênio e de CO<sub>2</sub> no meio (TARAGANO & PILOSOF, 1999). De acordo com NIGAM & SINGH (1994), a produtividade da fermentação em meio semi-sólido é significativamente afetada pela umidade do meio. O elevado teor de umidade inicial, afeta o crescimento do microrganismo, pois a porosidade do meio e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto (RAIMBAUT & ALAZARD, 1980). Por outro lado, em baixos teores de umidade inicial, a produção enzimática também é reduzida porque o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte e afetando o metabolismo microbiano (ACUÑA-ARGUELLES *et al.*, 1994). Portanto, o importante é trabalhar com uma umidade que mantenha o equilíbrio entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio.

Em seus experimentos, CASTILHO *et al.* (2000a) variaram a umidade inicial do meio de 25 a 70%, empregando farelos de trigo e soja como matérias-primas, na produção de pectinases por *A. niger* em meio semi-sólido. De acordo com os autores, os maiores valores de atividade poligalacturonase foram obtidos em 70 horas de fermentação, com 40 e 55% de umidade inicial, porém, deve ser considerado que o meio de cultura não foi submetido a aeração.

A maior atividade da enzima, obtida na condição de menor aeração, vai ao encontro dos resultados obtidos por outros autores. SHOJAOSADATI & BABAEIPOUR (2002) obtiveram maior produção de ácido cítrico, por *Aspergillus niger*, fazendo uso de um menor nível de aeração, 0,8 L/min. GHILDYAL *et al.* (1994) também obtiveram uma maior produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* quando fizeram uso da menor velocidade de aeração (5 L/min) utilizada em seus

experimentos, em reatores de coluna. Por outro lado, DOMÍNGUEZ *et al.* (2001) constataram que a produção enzimática triplicou ao se utilizar o maior nível de aeração (1,0 vvm), na produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* em cultivo em estado sólido. SREEKANTIAH *et al.* (1973) apud ABDEL-FATTAH & MABROUK (1977) estudaram a produção de poligalacturonase por onze cepas de fungos e descobriram que a aeração desfavorece a formação da enzima em *A. oryzae*, embora em *A. niger* houve um ligeiro aumento de produção quando o meio era submetido à aeração.

É importante ressaltar que, se por um lado os elevados níveis de aeração não favorecem o crescimento do microrganismo, por outro lado eles propiciam a redução do gradiente de temperatura no meio de fermentação semi-sólida. Porém, a utilização de reatores de coluna permite, devido à sua geometria e à pequena quantidade de substrato sólido utilizada, que a temperatura do leito de fermentação seja mantida ao longo do processo, uma vez que a remoção do calor pelas paredes da coluna é eficiente (DURAND, 2003). Dessa forma, a preocupação com a influência do nível de aeração no processo esteve centrada, neste trabalho, sobre a umidade do meio e a formação da enzima poligalacturonase.

No presente trabalho, as atividades poligalacturonase variaram de 8,63 a 10,70 U/mL (Tabela 4.3). Estes valores estão acima dos encontrados por outros autores, conforme descrito na literatura. DANIEL *et al.* (1996) obtiveram 1,40 U/mL de atividade poligalacturonase ao utilizar como substrato sólido cascas de limão e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio, em 46h de fermentação com a linhagem *A. niger* mutante M21, enquanto TRINDADE *et al.* (1996) ao utilizarem como substratos resíduos do processamento de acerola, morango e maracujá, obtiveram atividades inferiores a 0,6 U/mL.

Foi verificada uma redução considerável da umidade final do meio de fermentação (Tabela 4.3). O ar utilizado para aeração do meio foi o do ambiente sem umidificação prévia e, desta forma, houve um arraste previsto de água livre.

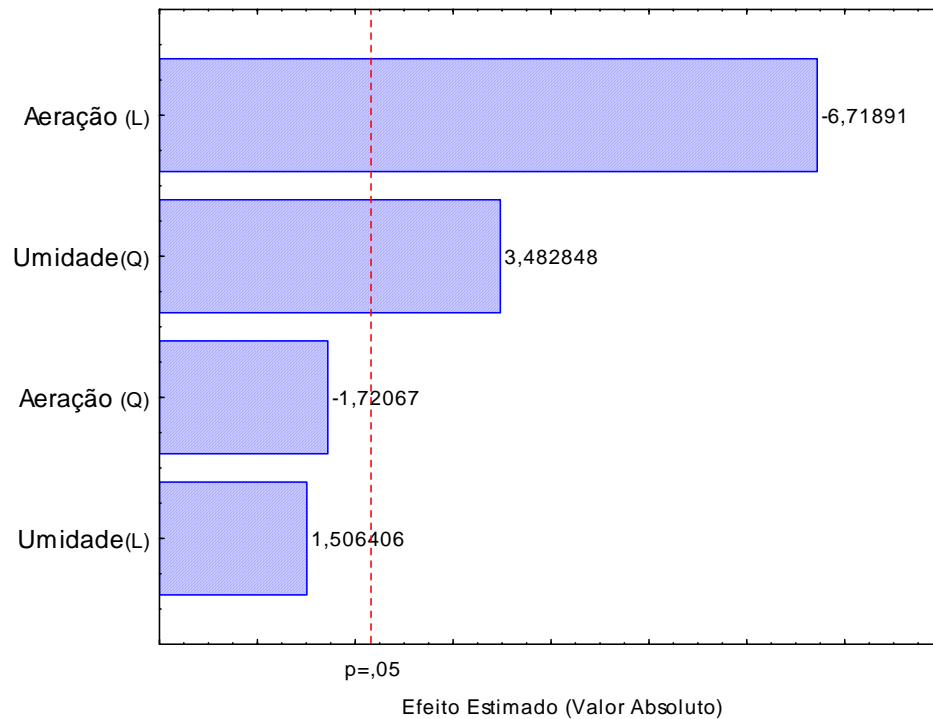
Observou-se que quanto menor a umidade inicial e maior a aeração, menor foi a atividade de protease (Tabela 4.3), ou seja, provavelmente a interação dos dois fatores, umidade e aeração do meio de fermentação, deve inibir a síntese de protease.

Através da construção do Gráfico de Pareto (Figura 4.3), que apresenta os valores do teste “t de student”, foi possível observar o efeito das variáveis independentes sobre a atividade de poligalacturonase. Verificou-se que, nos limites estabelecidos, as variáveis aeração (linear) e umidade (quadrática) mostraram-se significativas, com nível de significância de  $p = 0,05$ .

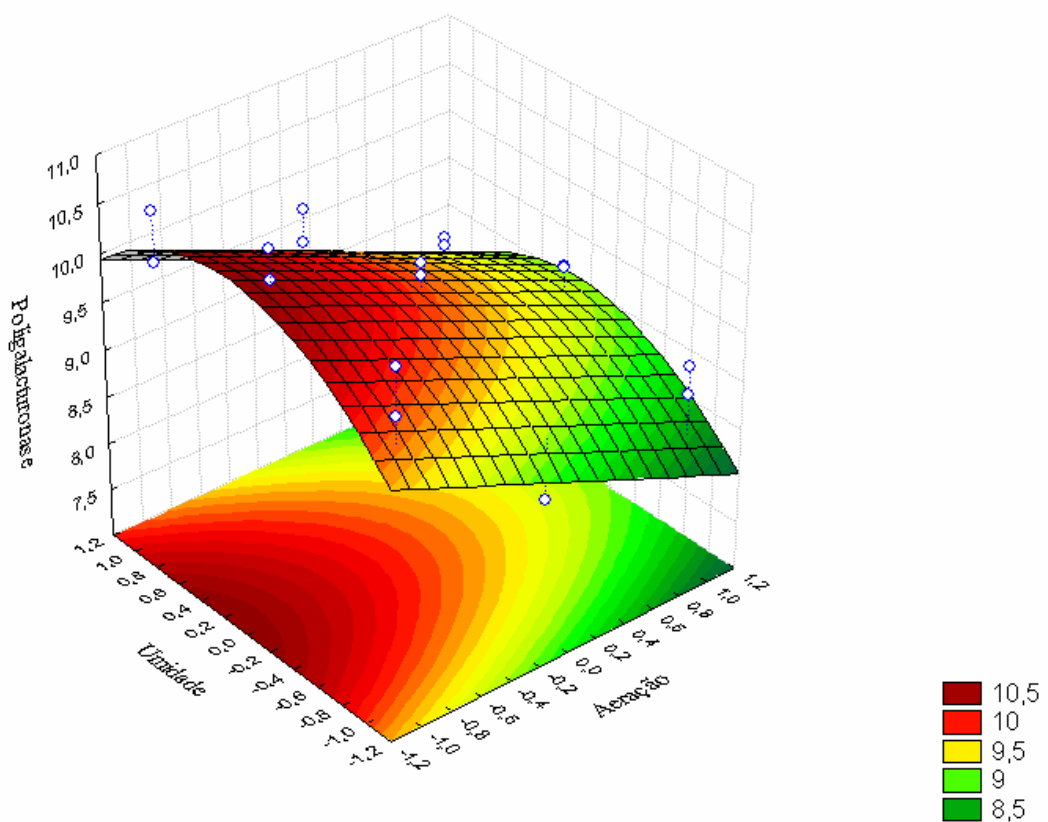
A Figura 4.4 mostrou que a umidade inicial do meio em torno de 60%, em condições de baixa aeração (0,5 vvm), caracteriza uma região de ótimo de produção de atividade de poligalacturonase sendo estas, portanto, as condições mais adequadas para a produção da enzima. Com base na região que representa aerações menores que 0,5 vvm, maiores atividades de poligalacturonase poderiam ser obtidas, porém, restrições técnicas referentes ao controlador de vazão do ar, impediram o trabalho com vazões de ar inferiores a 0,5 vvm.

Com base nos coeficientes de regressão, foi construído o modelo estatístico que permite relacionar a atividade da enzima poligalacturonase com as variáveis independentes (codificadas), aeração e umidade inicial, como mostra a Equação 2:

$$PG = 9,827 - 0,654A + 0,147U - 0,587U^2 \quad (\text{Eq. 2})$$



**Figura 4.3** – Efeito da aeração e da umidade inicial do meio sobre a atividade poligalacturonásica



**Figura 4.4** – Superfície de resposta da atividade de poligalacturonase em função dos valores codificados da umidade inicial do meio e da aeração

Onde:

A = aeração (vvm) do meio (codificado no item 3.9)

U = umidade inicial (%) do meio de fermentação (codificado no item 3.9)

PG = atividade poligalacturonase (U/mL)

Este modelo permitiu a obtenção da condição ótima da umidade inicial do meio como sendo de 62,5%. Então, para a próxima etapa de experimentos, ficou determinado que os valores de umidade inicial do meio e aeração serão, respectivamente, 62,5% e 0,5vvm.

#### 4.4 Efeito das Fontes de Nitrogênio e da Concentração da Fonte de Fósforo na Síntese Enzimática

O efeito da fonte de nitrogênio na síntese de enzimas pectinolíticas por microrganismos tem sido o foco de vários estudos. De acordo com CHOPRA & METHA (1985) *apud* LEUCHTENBERGER *et al.* (1989), a aplicação de diferentes fontes de nitrogênio altera a produção de enzimas pectinolíticas por *A. niger*.

Nesta etapa de experimentos, avaliou-se o efeito da utilização de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  ou  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , como de fonte de nitrogênio (mantendo-se a concentração de nitrogênio disponível no meio em 0,077%) e a adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , em diferentes concentrações, como fonte de fósforo, na produção da enzima poligalacturonase, conforme planejamento experimental (item 3.7.3).

A Tabela 4.4 mostra os valores médios das atividades das enzimas poligalacturonase e protease e da umidade final do meio, em função das diferentes fontes de nitrogênio e concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , encontrados após 48 horas de fermentação.

**Tabela 4.4** – Atividades de poligalacturonase e protease e umidade final do meio, tendo como variáveis a fonte de nitrogênio e a concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Condições		Resultados*		
Fonte de Nitrogênio	Concentração $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (%)	Poligalacturonase (U/mL)	Protease (U/mL)	Umidade Final (%)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	10,71	4,34	45
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,3	11,14	4,62	48
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6	10,52	6,08	53
$\text{NaNO}_3$	0	10,62	5,23	45
$\text{NaNO}_3$	0,3	10,73	5,72	52
$\text{NaNO}_3$	0,6	10,50	5,35	44
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0	10,80	5,38	48
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0,3	11,51	5,46	49
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0,6	10,28	5,64	47

\* Os resultados consistem na média de 2 experimentos com um erro menor que 5%

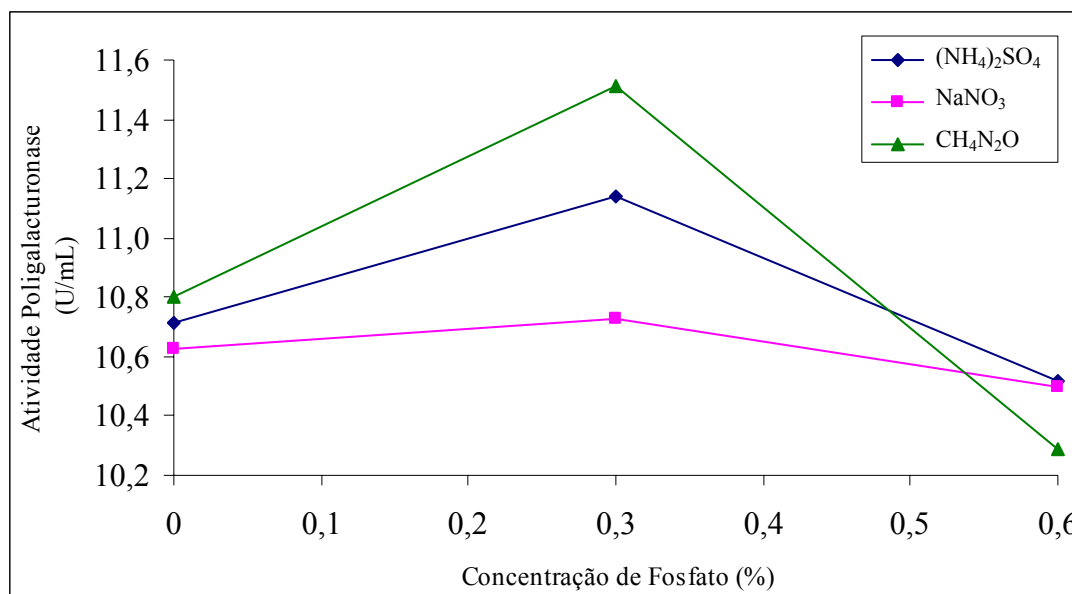
Os resultados, expostos na Tabela 4.4 indicaram que em todas as condições testadas os valores da umidade final foram semelhantes. Com relação à atividade da enzima protease, observou-se que com a utilização de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como fonte de nitrogênio, em ausência ou baixa concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , houve uma ligeira redução na síntese da enzima. Entretanto, a utilização dessa mesma fonte de nitrogênio, com concentração 0,6% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pareceu favorecer a síntese de protease. Para as demais fontes de nitrogênio, os valores de atividade protease foram semelhantes, independente



da concentração da fonte de fósforo.

As atividades de poligalacturonase variaram de 10,28 a 11,51 U/mL e estes resultados foram submetidos a análise de variância. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A análise estatística, com nível de significância de  $p < 0,05$ , mostrou que houve diferença significativa entre os dados obtidos, em termos de produção de poligalacturonase, tanto com relação à fonte de nitrogênio empregada, quanto à concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , bem como para a interação entre ambas.

Os valores médios de atividade da enzima poligalacturonase podem ser visualizados na Figura 4.5.



**Figura 4.5** – Atividade poligalacturonase em função da concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , em 48 horas de fermentação semi-sólida, com diferentes fontes de nitrogênio

No intervalo avaliado, analisando-se independentemente as fontes de nitrogênio, pelo Teste de Tukey, observou-se que: ao utilizar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,3% foi a melhor concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a ser empregada visando obter maior atividade poligalacturonase, enquanto as demais concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tiveram o mesmo efeito na produção desta enzima; com a utilização de  $\text{NaNO}_3$ , todas as concentrações da fonte de fósforo tiveram efeito semelhante na produção de poligalacturonase, neste caso seria coerente não adicionar fonte de fósforo ao meio de cultura; na utilização de  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , as três concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  avaliadas apresentaram efeitos distintos, sendo 0,6% a concentração menos favorável à produção de poligalacturonase.

Embora os valores de atividade poligalacturonase obtidos com o emprego de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e de uréia, ambos utilizando concentração de 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , tenham sido bem próximos, optou-se em termos de custos empregados no processo, pela utilização da uréia, por ser um reagente mais barato. Além disso, a uréia proporcionou um ligeiro aumento na atividade enzimática, em relação ao  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Dentre os valores testados, a maior atividade da enzima poligalacturonase (11,51 U/mL) foi obtida com a utilização da uréia, como fonte de nitrogênio e adição de uma fonte de fósforo, no caso  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , na concentração de 0,3%. Assim, os resultados apresentados na Figura 4.5, conduziram à escolha de uma fonte de nitrogênio orgânica, para a composição do meio de fermentação contendo resíduo de maracujá e farelo de

trigo.

O trabalho de GUTIERREZ-CORREA & TENDERDY (1998), conduzido pelo cultivo misto de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis* mostrou o favorecimento da produção de xilanases na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica, em comparação à utilização de fontes inorgânicas nos meios de cultivo. Por outro lado, o estudo da influência da fonte de nitrogênio, na produção de inulinase por *A. niger* 3T5B8, em meio semi-sólido, realizado por VALADÃO (2005) apontou o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como sendo a melhor fonte de nitrogênio, sendo que a uréia não constava entre as fontes avaliadas. De um modo geral, os experimentos de fermentação semi-sólida com a linhagem *A. niger* mutante 3T5B8, utilizam  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio, isso pode ser verificado nos trabalhos desenvolvidos por GOMES (1995), COURI *et al.* (2000), NEVES (2003), dentre outros disponíveis na literatura.

KHANNA *et al.* (1980) avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de poligalacturonase por *A. niger* em fermentação submersa e dentre as sete fontes de nitrogênio avaliadas por estes autores, os melhores resultados foram obtidos com a utilização da uréia, seguido por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , após 96h de fermentação a 30°C. O mesmo foi constatado na pesquisa realizada por DANIEL *et al.* (1996) visando a produção de pectinases por *A. niger* mutante M21. As fermentações foram conduzidas utilizando-se cascas de limão como substrato sólido,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  como fonte de fósforo e foi avaliada a utilização de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou uréia como fonte de nitrogênio. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que o emprego da uréia como fonte de nitrogênio foi o mais eficiente, por conduzir a uma cinética mais rápida e uma maior produção de poligalacturonase durante as primeiras horas de fermentação, provavelmente devido a um efeito tamponante. Os autores comprovaram, ainda, que a mistura de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e uréia não apresentou benefícios, uma vez que os níveis de produção encontrados mostraram-se similares aos obtidos com a utilização de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apenas.

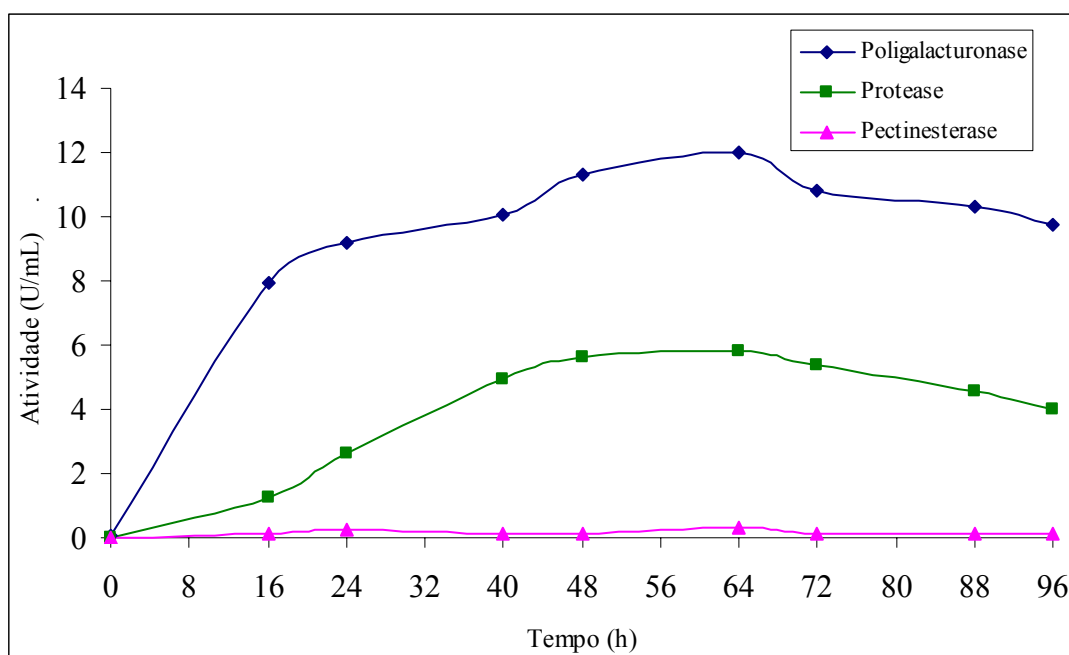
A produção de enzimas pectinolíticas por fermentação semi-sólida, tendo como substrato diferentes rejeitos e subprodutos da prática agroindustrial, foi investigada por TRINDADE *et al.* (1996). Foi possível observar que nos meios de cultivo compostos por farelos (de trigo e de soja), os autores adicionaram apenas  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como fonte de nitrogênio, enquanto para os demais resíduos (resíduos da fabricação de polpa congelada de morango, maracujá e acerola, cascas de laranja e maçã e borra de café), além da adição da fonte de nitrogênio, houve a necessidade da adição de uma fonte complementar de fósforo, sendo utilizados  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

#### 4.5 Estudo Cinético do Processo

Tendo em vista as condições pré-estabelecidas (meio composto por 33,25% de resíduo de maracujá em farelo de trigo, umidificado a 62,5% com solução nutriente 0,43% de uréia e 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em HCl 0,1M, sob aeração de 0,5 vvm), foi realizado o estudo cinético do processo.

O máximo de atividade poligalacturonase (12 U/mL) foi alcançado em 64 horas de fermentação, conforme mostrado na Figura 4.6. Neste ponto, a atividade protease também atingiu seu valor máximo de 5,7 U/mL.

Em 48 horas de fermentação, a atividade da enzima poligalacturonase apresentou um aumento de 96,19% em relação ao primeiro meio estudado, que era composto por farelo de trigo, sem adição de resíduo de maracujá, umidificado a 60% com solução 0,6% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em HCl 0,1M, sob aeração de 1,0 vvm a 32°C.



**Figura 4.6** – Cinética de produção das enzimas poligalacturonase, protease e pectinesterase pela linhagem *A. niger* mutante 3T5B8 em meio semi-sólido

A Tabela 4.5 expressa os resultados obtidos na cinética de produção das enzimas em U/g de substrato seco, haja visto que alguns autores utilizam essa unidade, dessa forma torna-se viável a comparação com todos os dados disponíveis na literatura.

**Tabela 4.5** – Atividades das enzimas poligalacturonase, protease e pectinesterase ao longo da fermentação

Tempo (h)	Poligalacturonase (U/g)	Protease (U/g)	Pectinesterase (U/g)
0	0,38	0,05	0,00
16	42,24	6,72	0,77
24	48,88	13,84	1,28
40	53,48	26,28	0,70
48	60,24	29,82	0,67
64	63,90	30,78	1,54
72	57,58	28,64	0,78
88	54,81	24,41	0,63
96	51,97	21,35	0,65

Considerando os dados apresentados na Figura 4.6, verificou-se que foram obtidas atividades poligalacturonase e protease superiores a alguns dados da literatura e em períodos de fermentação menores ou similares. TRINDADE *et al* (1996) também utilizaram resíduo do processamento de maracujá como substrato sólido e obtiveram atividade poligalacturonase máxima de 0,7 U/mL, em 96h de fermentação com *A niger* M21. COURI *et al.* (2000), com a mesma linhagem mutante utilizada nesse trabalho, obtiveram atividades de poligalacturonase e protease de 3,35 U/mL e 1,26 U/mL, respectivamente, em 72 horas de fermentação em bandejas de aço, utilizando cascas de manga como substrato semi-sólido. SILVA *et al.* (2005b)

utilizando meio de farelo de trigo e bagaço de laranja na proporção 1:1, com *Penicillium viridicatum* RFC3, tendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio e 80% de umidade inicial do meio, obtiveram em 64 horas de fermentação, atividade poligalacturonase 2,5 U/mL, aproximadamente, atingindo o valor máximo de 8,9 U/mL em 336 horas de fermentação.

DARTORA *et al.* (1999) compararam diferentes fungos filamentosos (*A. oryzae* CCT3940, *A. niger* NRRL3122, *A. awamori* NRRL3112, *A. niger* e *Trichoderma* sp) com respeito à produção de pectinases em meio semi-sólido. O meio de cultivo teve como base farelo trigo com adição de indutor (10% de pectina). A máxima atividade pectinolítica, 90 U/g, foi verificada em 72 horas de cultivo, com *A. niger*.

A produção de proteases analisada por HECK *et al.* (2002), em meio farelo de soja, por *B. subtilis* BL 53, em 72 horas de fermentação, permitiu obter atividade 5,5 U/mL, valor similar aos encontrados nesse experimento (Figura 4.6). Já os valores de atividade protease observados por SANTOS *et al.* (2004), em meio de sementes de girassol, a 28°C, com o fungo *Penicillium fellutanum*, são superiores aos representados na Tabela 4.5, sendo obtido atividade protease de, aproximadamente, 45 U/g em 64 horas de fermentação e atividade máxima de 140 U/g em 160 horas de fermentação.

No presente trabalho, as metodologias utilizadas para a quantificação das enzimas xilanase e pectinoliase não permitiram detectá-las no extrato enzimático obtido e a atividade pectinesterase não ultrapassou 1,0 U/mL (Figura 4.6).

Fato semelhante foi observado nos experimentos de TRINDADE *et al.* (1996), que avaliaram, utilizando vários tipos de resíduos agroindustriais, as atividades poligalacturonásica e do complexo pectinolítico como um todo, envolvendo além da poligalacturonase, as enzimas pectinoliase, pectatoliase e pectinesterase. Os autores verificaram que as atividades pectinolíticas, determinadas pela medida de redução da viscosidade de uma solução de pectina 1% a 35°C e pH 4,5, foram bastante inferiores às atividades poligalacturonásicas e, como a atividade pectinolítica é fruto da ação sinérgica das diferentes enzimas deste complexo enzimático, este fato sugere que, embora a produção de poligalacturonase tenha sido bastante acentuada, a síntese das outras enzimas pectinolíticas (pectinesterase, pectatoliase e pectinoliase) não foi favorecida, corroborando, também, com os resultados obtidos por DANIEL *et al.* (1996). De acordo com CERVONE *et al.* (1987), nos frutos a poligalacturonase é a primeira enzima hidrolítica sintetizada, indicando que o microrganismo tende a degradar primeiramente as pectinas pouco metoxiladas. Há evidências de que, em muitos casos, a poligalacturonase atua antes das demais enzimas degradadoras, podendo hidrolisar seus substratos.

BRUMANO *et al.* (1993) observaram que os fungos filamentosos *Penicillium griseoroseum* são bons produtores de pectinoliase quando crescidos em meios que contêm pectina como indutor natural, embora a produção dessa enzima seja mais eficiente em meios que utilizam sacarose como fonte de carbono e energia, sem a presença de substâncias pecticas. Embora, com *Penicillium viridicatum* RFC3, SILVA *et al.* (2005b) utilizando meio de farelo de trigo e bagaço de laranja, obtiveram atividade pectinoliase de aproximadamente 40 U/mL em 64 horas de fermentação, chegando a 60 U/mL em 96 horas de processo. Quanto às atividades de pectinesterase e xilanase, os valores obtidos pelos autores foram 5 U/mL e 0,1 U/mL, respectivamente, em 64 horas de fermentação. Produções elevadíssimas de pectinoliase foram relatadas por SILVA *et al.* (2002) em fermentação semi-sólida tendo como substratos resíduos agroindustriais. Ao utilizar bagaços de cana-de-açúcar e de laranja, os autores chegaram a obter atividade pectinoliase de 2500 U/g, em 12 dias de cultivo, enquanto a atividade poligalacturonase máxima foi 9 U/g, em 8 dias de cultivo. A influência do substrato

sólido na produção de enzimas pectinolíticas também foi estudada por GOMES (1995). Utilizando farelos de trigo e de soja como substrato, os maiores valores de atividade poligalacturonase e pectinoliase obtidos pelos autores foram 13,0 e 0,6 U/mL, respectivamente, em 24h de fermentação.

Em seus estudos acerca da degradação da pectina, DINGLE *et al.* (1953) relataram que a pectinesterase somente pode ser produzida na ausência de poligalacturonase, pois é altamente influenciada pela concentração da mesma.

Os valores de atividade pectinesterase apresentados na Tabela 4.5 são bem semelhantes aos obtidos por TARAGANO & PILOSOFF (1999) com *A. niger* em meio de farelo de trigo suplementado com pectina a 1%, que ficaram próximos a 1 U/g. Os autores observaram ainda, que a produção de pectinesterase em meio semi-sólido é 30% maior quando comparada à produção em meio submerso.

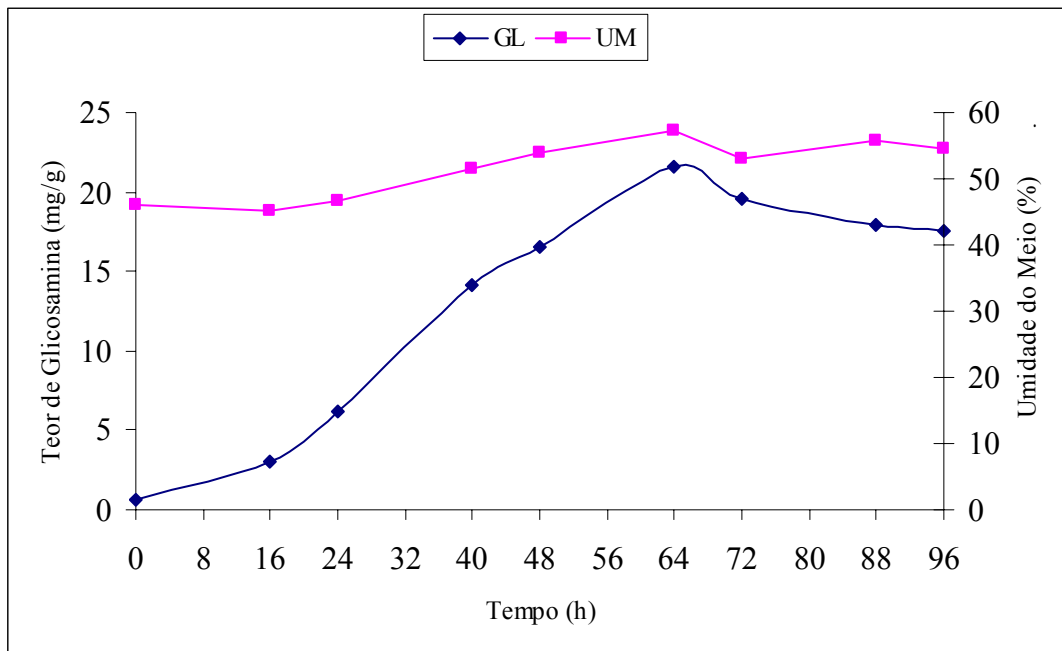
Com relação à atividade de xilanase, COURI *et al.* (2000) utilizando *A. niger* 3T5B8, tendo casca de manga como matéria-prima, verificaram atividade de 11,26 U/mL, em 72 horas de processo. REZENDE *et al.* (2002) utilizaram a cepa *Trichoderma harzianum*, tendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar em fermentação semi-sólida a 28°C, e obtiveram atividade xilanase máxima de 287,8 U/mL em 7 dias de fermentação. Também com bagaço de cana-de-açúcar, LEMOS *et al.* (2000) alcançaram atividade xilanase de 30 U/mL, com o fungo *A. awamori*. HECK *et al.* (2002) analisaram a produção de enzimas por cinco cepas de *Bacillus* em meio farelo de soja e a cepa que se mostrou mais eficiente foi *B. subtilis* BL 53 em 72 horas de fermentação, com atividade xilanase de 2,6 U/mL. Enquanto KANG *et al.* (2004) utilizando o fungo mutante *A. niger* KK2, em meio de palha de arroz, obtiveram atividade xilanase de 5070 U/g em 5 dias de fermentação a 28°C. Porém, deve ser levado em consideração que os níveis de produção e o perfil cinético são fortemente influenciados pela natureza do substrato sólido empregado no processo e pelo microrganismo utilizado.

Observou-se, no presente trabalho, que a umidade do meio de fermentação (Figura 4.7), que inicialmente era 46,10%, aumentou durante o processo fermentativo chegando a 57,27% no ponto de maior atividade poligalacturonase. O aumento da umidade do meio observado ao longo da fermentação, deve-se provavelmente, ao ar de entrada que apresentava, na ocasião, umidade relativa maior que a umidade do meio. Outro fator que pode ter proporcionado esse acréscimo na umidade do meio foi a diferença de temperatura entre o sistema de cultivo e o ambiente externo, favorecendo a condensação de líquido no topo das colunas que não estavam submersas no banho termostático. Assim, o líquido condensado escoava pelas paredes da coluna, umidificando o meio de cultivo.

A biomassa, quantificada através do conteúdo de glicosamina que é um açúcar presente na parede celular dos fungos, teve seu valor máximo (21,54 mg/g) em 64 horas de fermentação (Figura 4.7). A curva de crescimento tem um perfil clássico uma vez que pode-se observar as fases inicial e exponencial bem definidas. Após esse período, verificou-se o declínio da biomassa, principalmente devido à escassez de nutrientes no meio, já que estes foram consumidos pelos microrganismos e não foram repostos ao longo do processo, provavelmente houve lise celular e com isso, os componentes da parede celular, que teve sua estrutura comprometida, provavelmente foram utilizados como fonte de carbono, pelo microrganismo que continua em atividade.

Comparando-se o pico de biomassa obtido (21,54 mg/g) com os alcançados nos experimentos de NEVES (2003) e VALADÃO (2005), realizados em placas de petri e bandejas, respectivamente, observou-se que houve boa produção micelial de *A. niger* 3T5B8 nos cultivos semi-sólidos efetuados em reatores de coluna. Ambos os

autores utilizaram a linhagem *A. niger* 3T5B8 e obtiveram teores de glicosamina inferiores a 3,5 mg/g. Resultado similar ao verificado nesse estudo, pode ser observado no trabalho de PANDEY *et al.* (1996), que avaliaram a síntese de glucoamilase por *A. niger* em função da altura do leito, utilizando reatores de coluna, e obtiveram biomassa de 30 mg/g. Por outro lado, GELMI *et al.* (2000) obtiveram concentração máxima de biomassa de 40,0 mg/g, praticamente o dobro do valor aqui descrito, utilizando *Gibberella fujikuroi*, em reatores de coluna.



**Figura 4.7** – Cinética do crescimento microbiano medido pelo teor de glicosamina e da umidade do meio de fermentação

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

Os resultados indicaram a potencialidade do emprego do resíduo de maracujá, como indutor e substrato, abundante e de baixo custo, na síntese da enzima poligalacturonase por fermentação semi-sólida, em biorreatores de coluna, utilizando a linhagem *A. niger* mutante 3T5B8.

Dentro dos limites das variáveis estudadas, concluiu-se que:

- As variações das concentrações de resíduo de maracujá e de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram significativas na produção da enzima. Segundo o modelo ajustado, as condições ótimas de produção foram: 33,25% de resíduo de maracujá e 0,94% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;
- Dentre as taxas de aeração testadas, a menor aeração (0,5vvm) foi a mais adequada para a produção de poligalacturonase, também foi estabelecido 62,5% de umidade inicial como condição ótima para produção de poligalacturonase, conforme modelo ajustado;
- A fonte de nitrogênio mais adequada foi a uréia. Constatou-se também, que a adição de 0,30% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , como fonte de fósforo, aumentou a produção da enzima poligalacturonase.

Portanto, dentre as condições experimentais empregadas, as condições mais adequadas à síntese de poligalacturonase pela linhagem *A. niger* mutante 3T5B8, por fermentação semi-sólida, utilizando biorreatores de coluna, foram: farelo de trigo enriquecido com 33,25% de resíduo de maracujá, umidificado a 62,5% com solução 0,43% de  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  e 0,30% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em HCl 0,1 M, sob aeração de 0,5 vvm a 32°C. Nessas condições, verificou-se que:

- O extrato enzimático obtido apresentou atividade máxima das enzimas poligalacturonase (12,01 U/mL), pectinesterase (0,29 U/mL) e protease (5,78 U/mL) em 64 horas de fermentação e as enzimas pectinoliase e xilanase não foram detectadas pelos métodos empregados;
- Os valores das atividades enzimáticas obtidos durante a cinética, sugerem um tempo máximo de fermentação de 64 horas para a recuperação do extrato enzimático, haja visto que após esse período ocorreu um declínio na produção de poligalacturonase e das demais enzimas analisadas.

### 5.2 Sugestões

Diante dos resultados e dos objetivos alcançados, propõem-se ainda, algumas sugestões para a continuidade deste trabalho, de forma a garantir um melhor desempenho do processo de fermentação. Como recomendações de pesquisa para trabalhos futuros, utilizando farelo de trigo e resíduo do processamento de maracujá como matérias-primas para produção de poligalacturonase, pela técnica de fermentação

semi-sólida, propõe-se:

- Variar a altura de preenchimento dos reatores de coluna e avaliar a influência desta variação sobre a produção da enzima e a formação da biomassa;
- Estudar aspectos referentes aos tratamentos finais do processo, incluindo metodologias para recuperação e purificação e caracterização das enzimas produzidas;
- Utilizar o extrato enzimático obtido em processos de clarificação de sucos de frutas, avaliando sua eficiência através de comparação com enzimas comerciais.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, A. F.; MABROUX, S. S. Production of polygalacturonase pectin-methylesterase by fungi. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm**, v.5, p.38-41, 1977.

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

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

ALANÃ, A.; ALKORTA, I.; DOMINGUEZ, J. B.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Pectin lyase activity in *Penicillium italicum* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3755-3759, 1990.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes – a review. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, p.21-28, 1998.

BANDELIER, S.; RENAUD, R.; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in a aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**, v.32, n.2, p.141-145, 1997.

BARENSE, R. I.; CHELLEGATTI, M. A. S. C.; FONSECA, M. J. V.; SAID, S. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II e III of *Penicillium frequentans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.327-330, 2001.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp QG-11-3 and its application in biobleaching of *Eucalyptus* kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n.7, p.459-466, 2000.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2ª ed., p.255-257, 1988.

BIESEBEKE, R. TE; RUIJTER, G.; RAHARDJO, Y. S. P. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yest Research**, v.2, n.2, p.245-248, 2002.

BLIX, S. The determination of hexosamines according to elson and morgam. **Acta Chemica Scandinavica**, v.2, p.467-478, 1948.

BORRIS, R. Biology of enzymes. In: REHM, H. J.; REED, O. G., (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH, v.7a., cap.2., 1987.

BRAMORSKI, A. ; SOCCOL, C. R. ; CHRISTEN, P. . REVAH, S. Fruity aroma

production by *Ceratocystis fimbriata* in a solid cultures from agro-industrial wastes. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.3, p.208-212, 1998.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.38-44, jul/set, 1999.

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

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseorosium* as a function of the inoculum and culture condition. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.9, p.225-228, 1993.

BUCHERT, J.; TENKANEN, M.; KANTELINEN, A.; VIKARI, L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v.50, p.65-72, 1994.

CARR, J. G. Tea, coffee and cocoa. In: WOOD, B. J. B., (Ed.). **Microbiology of Fermented Foods**, v.2. London: Elsevier science ltd.; p.133-154, 1985.

CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; COURI, S.; LEITE, S. G. F.; MEDRONHO, R. A. Escolha de linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de pectinases e caracterização do complexo enzimático obtido. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 11, 1996, Rio de Janeiro. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Rio de Janeiro: [s.n.], p.1466-1471, 1996.

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

CASTILHO L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA Jr., G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, n.3, p.239-247, 2000b.

CERVONE, F.; LORENZO, G. DE; DEGRÀ, L.; SALVI, G.; BERGAMI, M. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.**, v.85, p.631-637, 1987.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A Colorimetric Method for the Determination of the Proteolytic Activity of Duodenal Juice. **Journal Biology Chemistry**, v.170, n.23, p.501-505, 1947.

CODNER, R. C. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. **Journal of Applied Bacteriology**, v.84, p.147-160, 2001.

COLLET, L. S. F. C. A.; SHIGEOKA, D. S.; BADOLATO, G. G.; TADINI, C. C. A

Kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice. **Journal of Food Engineering**, v.69, p.125-129, 2005.

CORDOVA-LOPEZ, J.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; HUERTA, S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. **Biotechnology Techniques**, v.10, n.1, p.1-6, 1996.

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

COURI, S.; FARIAS, A. X.. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.26, p.314-317, 1995.

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.

COSGROVE, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annual Review Cell and Developmental Biology**, v.13, p.171-201, 1997.

DANIEL, M. R.; TRINDADE, V.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Influência do pH na produção de pectinases usando casca de limão como meio semi-sólido. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 5, 1996, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, Maringá: UEM, 1996. Disponível em: <[http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral\\_11.pdf](http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral_11.pdf)> . Acesso em: 08 nov. 2005.

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; SACANDOLARA, C.; COSTA, J. A. V.; SILVEIRA, M. M. Estudo comparativo da produção de pectinases por fermentação semi-sólida com diferentes fungos filamentosos. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 6, 1999, Maringá. **Anais do VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, Maringá: UEM, 1996. Disponível em: <[http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/VI%20sheb/Oral/Oral\\_24.pdf](http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/VI%20sheb/Oral/Oral_24.pdf)> . Acesso em: 14 ago. 2005.

DE ARAUJO, A. A.; LEPILLEUR, C.; DELCOURT, S.; COLAVITTI, P.; ROUSSOS, S. Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Eds.) **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.93-111, 1997.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v.83, p.89-94, 2002.

DELGADO, L.; TREJO, B. A.; HUITRÓN, C.; AGUILAR, G. Pectin lyase from *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.515-519, 1992.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.35, p.200-205, 1991.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. **J. Sci. Food Agric.**, v.4, p.149-155, 1953.

DOMÍNGUEZ, M.; MEJÍA, A; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Respiration studies on *Penicillium* Solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, n.5, p.409-413, 2000.

DOMÍNGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, S. R. ; SANROMÁN, M.A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on a inert support. **Process Biochemistry**, v.37, n.5, p.549-554, 2001.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.(2-3), p.113-125, 2003.

DURAND, A. ; BROISE, D. DE LA; BLACHÈRE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, v.8, p.59-66, 1988.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. **Biotechnology Advances**, V.11, p.591-597, 1993.

EL-REFAI, A. A.; METWALLI, S. M.; EL-SEBAIY, L. A. Influence of pH, inoculum concentration, aeration and growth period on production of pectolytic enzymes by *Aspergillus awamori* 16. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm**, v.8, p.115-117, 1984.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de fruticultura**, v.26, n.1, p.101-102, 2004.

FROST, M. G.; MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentation. In: REHM, H. J.; REED, O. G., (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH, v.7a, 1987.

FULLBROOK, P. D. Kinetics. In: GODFREY, T.; REICHEL, J., (Ed.). **Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry**, Great Britain: The Nature, 1983.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**, v.35, p.1227-1233, 2000.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* and GA<sub>3</sub> production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.37, p.1033-1040, 2002.

GERVAIS, P. ; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.(2-3), p.85-101, 2003.

GHILDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAO, R. K. S. M. S.; KARANTH, N. G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.3, p.253-257, 1994.

GOMES, C. A. O. Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 78p., 1995.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.701-707, 1992.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGEDY, R. P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v.20, n.1, p.45-47, 1998.

HAN, Y. W. ; Oxygen requirement for growth of *Candida utilis* on Semisolid straw substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.672-674, 1987.

HASAN, S. D. M. ; COSTA, J. A. V. ; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.10, p.787-791, 1998.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p.213-218, 2002.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TIWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.59, p.409-418, 2000.

HOUDERT, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides. **Carbohydrate polymers**, v.16, p.409-432, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2002**. Disponível em: <<http://www.ibge.br/home/estatistica/economia/pam/2002>> . Acesso em: mai. 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Cereais e amiláceos. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3ª ed., São Paulo, v.1, p.14-62, 1976.

JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment**, Oxford, n.7, p.153-164, 1984.

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

JÖRGENSEN, A. **Microbiología de las Fermentaciones Industriales**. Zaragoza: editorial Acribia, 7ª ed., p.185-249, cap.7, 1959.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulose biomass. **Bioresource Technology**, v.91, p.153-156, 2004.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v.86, n.3, p.207-213, 2003.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; SINGH, K.; DADICH, K. S.; HOONDAL, G. S. Application of alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus sp.* MG-cp-2 in Degumming of Ramie (*Boehmeria nivea*) and Sunn Hemp (*Crotolaria juncia*) Bast Fibers. **Process Biochemistry**, v.36, p.803-807, 2001.

KASHYAP, D. R.; SONI, S. K.; TEWARI, R. Enhanced Production of Pectinase by *Bacillus sp.* DT7 using solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v.88, p.251-254, 2003.

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

KHANNA, P. K.; SETHI, R. P.; TEWARI, H. K. Production of poligalacturonase and pectin methyl esterase by *Aspergillus niger* C1. **Journal Res. Punjab Agric. Univ.**, v.18, n.4, p.415-420, 1981.

KITTUR, F. S.; KUMAR, A. B. V.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N. Chitosanolsis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger* – a non-Specific Activity. **Carbohydrate Polymers**, v.53, p.191-196, 2003.

KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOH, K. Exopolygalacturonase from Suspensión Cultures of *Marchantia polymorpha*: its presence and involviment in pectic polysaccharide degradation. **Plant Physiology**, v.73, p.216, 1983.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Ed Sarvier, 2ª ed., São Paulo, 1995.

LEITÃO, M. C. A.; SILVA, M. L. A.; JANUÁRIO, M. I. N.; AZINHEIRA, H. G. Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.165-169, 1995.

LEKHA, P.K. ; LONSANE, B.K. Biomass estimation in solid state fermentation. In: PANDEY, A (Ed.), **Solid State Fermentation**, Wiley Eastern Limited, India, p.38-48, 1994.

LEMOS, J. L. S.; BON, E. P. S.; SANTANA, M. F. E.; PEREIRA JR, N. thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.3, p.205-210, 2000.

LEUCHTENBERGER, A.; FRIESE, E.; RUTTLOFF, H. Variation of polygalacturonase and pectinesterase synthesis by aggregated mycelium of *Aspergillus niger* in dependence on the carbon source. **Biotechnology Letters**, v.11, n.4, p.255-258, 1989.

LOERA, O.; AGUIRRE, J.; VINIEGRA-GONZÁLES, G. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.103-108, 1999.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering Aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, n.6, p.258-265, 1985.

LONSANE, B.K. ; SAUCEDO-CASTANEDA, G. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHMA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.27, n.5, p.259-273, 1991.

LUCENA-NETO, S. A.; FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.86-90, 2004.

McCREADY, P. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials. **analytical chemistry**, Washington, v.24, n.12, p.1586-1588, 1952.

MAGGE, R. J.; KOSARIC, M. Bioconversion of hemicellulose. **Advances Biochemical Engineering /Biotechnology**, v.32, p.61-93, 1985.

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

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of Medium Composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.693-702, 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Journal of Biology and Technology**, v.47, p.813-819, 2004.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of

thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v.37, p.949-954, 2002.

MEYER, A. S.; KÖSER, C.; ADLER-NISSEN, J. Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and finig treatments on turbidity and haze in cherry juice. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.3644-3650, 2001.

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

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characteristics and potential in solis substrate cultivation. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, S. A.; ROLZ, C. E. (Eds.), **Applied Biotechnology Series**. Elsevier, Amsterdam, p.1-16, 1992.

MITCHELL, D.A. ; BEROVIC, M. ; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.68, p.61-138, 2000.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes – a review. **Bioprocess Engineering**, v.19, n.5, p.355-361, 1998.

NAMPOOTHIRI, K. M.; BAIJU, T. V.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitanase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v.39, p.1583-1590, 2004.

NANDAKUMAR, M. P.; THAKUR, M. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.380-384, 1999.

NERY, I. A. Acompanhamento cinético da linhagem mutante *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação semi-sólida. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 82p., 1995.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S., (Eds.). **Proteolytic Enzymes a Pratical Approach**. Oxford, UK: IRL Press, p. 1-13, 1989.

NEVES, B. C. V. Monitoramento do crescimento do *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação semi-sólida usando a técnica de análise de imagem. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, agosto, 2003.

NIGAM, P. ; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, v.34, n.6, p.405-423, 1994.

NOSB. National Organic Standards Board. **Enzymes, Plant and Fungal**, 1999. Disponível em: <[http://www.omri.org/Enzymes\\_processing.pdf](http://www.omri.org/Enzymes_processing.pdf)> . Acesso em: 05 jun.



2005.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. **Process Biochemistry**, v.31, n.1, p.43-46, 1996.

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

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

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

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, casual agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v.104, n.6, p.671-675, 2000.

PICCOLI-VALLE, R. H.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoforme* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.135-140, 2001.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.9, p.199-209, 1980.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.597-635, 1998.

REID, I.; RICHARD, M. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.499-504, 2004.

REVILLA, I.; GANZALEZ-SAN JOSE, M. L. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. **International Journal of Food Science Technology**, v.38, p.29-36, 2003.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. Pectic enzymes. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.33, p.323-385, 1976.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum rifai* by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.67-72, 2002.

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

ROSENBOHM, C.; LUNDT, I.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; YOUNG, N. W. G. Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**, v.338, p.637-649, 2003.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**. Editora Eventos e Livraria, 121p., 2002.

SAKAMOTO, T.; HOURS, R. A.; SAKAI, T. Purification, characterization and production of two pect-transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p.353-358, 1994.

SAKAI, T.; OKUSHIMA, M. Purification and crystallisation of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, p.667-776, 1982.

SAKURAI, Y.; LEE, T. H.; SHIOTA, H. On the convenient for glucosamine estimation in koji. **Agriculture Biology Chemistry**, v.41, n.4, p.619-624, 1997.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in Submerged and Solid-State Fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, p.2689-2694, 2005.

SANTOS, E. dos. Produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 em cultivo semi-sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**, FAENQUIL, Lorena, SP, 2001.

SANTOS, M. M.; ROSA, A. S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresource Technology**, v.93, n.3, p.261-268, 2004.

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

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.802-808, 1990.

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

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

SENTHILKUMAR, S. R.; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by

*Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v.96, p.1380-1386, 2005.

SHOJAOSADATI, S.A.; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, v.37, p.909-914, 2002.

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

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.4, p.318-324, 2002.

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

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

SOARES, M. M. C. N; SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* **Revista de Microbiologia**, v.30, p.299-303, 1999.

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

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.267-272, 1952.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbiol technology**, v.25, p.411-419, 1999.

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

THIEMANN, J. E. Construção de equipamentos de fermentação. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, SP, v.2, p.179-190, 2001.

THOMPSON, N. S. Hemicellulose as a biomass resource. In: SOLTERS, E. J. (Ed.). **Wood and Agricultural Residues**. Research on Use for Food, Fuel and Chemical. Academic Press, San Diego, p.101-119, 1983.

TRINDADE, V.; DANIEL, M. R.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 5, 1996, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, Maringá: UEM, 1996. Disponível em: <[http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral\\_12.pdf](http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral_12.pdf)> . Acesso em: 05 jul. 2005.

TRUSWELL, A. S. Food fibre and blood lipids. **Nutrition Reviews**, Washington, v.35, n.3, p.51-54, 1997.

VALADÃO, R. C. Estudo da fermentação semi-sólida de uma linhagem selecionada de *Aspergillus niger* na produção de inulinase. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 53p., jul. 2005.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.74, p.175-178, 2000.

VIKARI, L.; TENAKANEN, M.; SUURNAKKI, A. Biotechnology in the pulp and paper industry. In: REHM, H. J., (Ed.). **Biotechnology**. VHC-Wiley; p.523-546, 2001.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzymes and Microbial Technology**, v.6, n.8, p.342-349, 1984.

WHITAKER, J. R. Microbiol pectinolytic enzymes. In: FOGART, W. M.; KELLY, C. T., (Ed.). **Microbiol Enzymes and Biotechnology**, 2<sup>nd</sup>. London: Elsevier Science Ltd.; p.133-176, 1990.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. **LWT-Food Science and Technology**, in press, 2005.

ZETELAKI, Z.; HARVÁTH. Factors affecting pectin lyase activity. **Acta Alimentaria**, v.11, n.1, p.21-29, 1982.