

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

TESE

**AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA UTILIZANDO
PEDÚNCULO DE CAJU SECO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES**

SIUMARA RODRIGUES ALCÂNTARA

Campina Grande – Paraíba

SIUMARA RODRIGUES ALCÂNTARA

AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA UTILIZANDO
PEDÚNCULO DE CAJU SECO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES

Tese apresentada ao Programa de
Doutorado em Engenharia de Processos do
Centro de Ciências e Tecnologia da
Universidade Federal de Campina Grande,
em cumprimento às exigências para
obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR:

Flávio Luiz Honorato da Silva

Campina Grande – Paraíba

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A347a Alcântara, Siumara Rodrigues.
Ampliação de escala do processo de fermentação semissólida utilizando pedúnculo de caju seco para produção de pectinases / Siumara Rodrigues Alcântara. – Campina Grande, 2013.
128 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2013.

"Orientação: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva".
Referências.

1. Fermentação Semissólida. 2. Poligalacturonase. 3. Biorreator Bandeja. 4. Suco de Maracujá. I. Silva, Flávio Luiz Honorato da. II. Título.

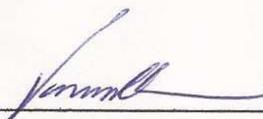
CDU 663.15(043)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE SIUMARA RODRIGUES ALCÂNTARA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE.

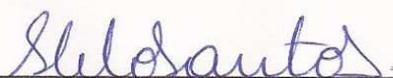
Tese de Doutorado **aprovada** em 06 de Junho de 2013.



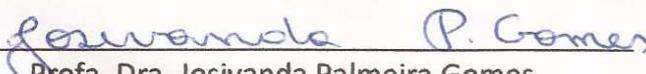
Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
DEQ / CT / UFPB
(Orientador)



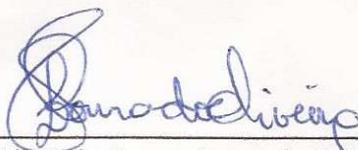
Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
IBILCE/UNESP
(Examinador Externo)



Profa. Dra. Sharline Fiorentino de Melo Santos
DEQ/CT/UFPB
(Examinador Externo)



Profa. Dra. Josivanda Palmeira Gomes
DEAG/CTRN/UFCG
(Examinadora Interna)



Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
DEQ/CCT/UFCG
(Examinadora Interna)

***A Deus,
A Nossa Senhora dos Milagres,
Aos meus pais e familiares.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e disposição de todos os dias. Por sempre ter me dado forças e esperanças de um dia melhor, em busca de um objetivo e da realização de um sonho. Pelas oportunidades que me foram dadas e pelas pessoas que conheci e me ajudaram nesta caminhada.

À minha mãe do céu, Nossa Senhora dos Milagres, por todos os milagres que testemunhei. Por senti-la sempre perto, intercedendo por mim.

Aos meus pais, pessoas maravilhosas que me ensinam e ensinaram a nunca desistir, a sempre buscar o melhor para mim. Por me darem força, nos momentos de fraqueza; ombros e ouvidos, nos momentos de tristeza e desânimo, broncas, nos momentos de atropelo e impaciência e pela orientação de todos os dias.

Às minhas irmãs, Clênia e Ana Carolina, pelo apoio, momentos de alegria e estresse compartilhados e opiniões dadas.

Ao meu noivo Adolfo, que me vê de um jeito único, fazendo-me sentir capaz de mudar o mundo. Pelo apoio, amor, carinho, paciência, compreensão, pelo incentivo e ensinamentos.

Aos amigos que fiz no LEB, que me ajudaram de um jeito especial: Ângela, Carlos Bispo, Flávia e Ezenildo. Às futuras engenheiras: Paloma e Nathalya, pelo suporte, apoio, auxílio e momentos de alegria, e a todos os demais, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Flávio Luiz, pelas orientações, amizade e confiança.

Às professoras Líbia e Josivanda, pelas participações nas bancas e sugestões. À Profa. Líbia pela confiança cedida a mim durante minha estadia no LEB.

À Coordenação de Doutorado em Engenharia de Processos e ao coordenador Prof. Gilson pelo incentivo e suporte.

Ao CNPq pela bolsa de incentivo.

SUMÁRIO

Introdução	01	
Objetivos	03	
Objetivo geral	03	
Objetivos específicos	03	
Capítulo 1 – Melhor condição da fermentação semissólida em escala bancada		
1.1	Fermentação semissólida (FSS)	05
1.2	Pectinases	07
1.3	Caju	08
1.4	<i>Aspergillus niger</i>	11
1.5	Estado da arte: concentração de inóculo, fonte de nitrogênio, umidade e temperatura	11
1.6	Materiais e métodos	13
1.6.1	Bagaço seco do pedúnculo de caju	13
1.6.2	Análises físico-químicas para caracterização do bagaço seco do pedúnculo de caju	14
1.6.2.1	Granulometria	14
1.6.2.2	Densidade aparente	15
1.6.2.3	pH	15
1.6.2.4	Umidade	15
1.6.2.5	Cinzas	16
1.6.2.6	Sólidos solúveis (°Brix)	16
1.6.2.7	Açúcares redutores (AR)	16
1.6.2.7.1	Curva padrão para determinação da relação entre a concentração de açúcares redutores e absorvância	17
1.6.2.7.2	Análise da concentração de açúcares redutores nas amostras	17
1.6.2.8	Açúcares redutores totais (ART)	18
1.6.2.9	Pectina	19
1.6.2.10	Proteína bruta	20

1.6.2.10.1	Reativo de Nessler	20
1.6.2.10.2	Digestão sulfúrica	20
1.6.2.10.3	Curva padrão para determinação da relação da concentração de nitrogênio e absorbância	21
1.6.2.10.4	Determinação da concentração de proteína bruta na amostra	21
1.6.3	Microrganismos	22
1.6.4	Processo fermentativo	22
1.6.4.1	Inóculo	22
1.6.4.2	Condições de cultivo	24
1.6.4.3	Planejamento experimental: melhor condição da fermentação em escala bancada	24
1.6.5	Extração do complexo enzimático	27
1.6.6	Determinação da atividade poligalacturonásica (PG)	27
1.7	Resultados e discussão	28
1.7.1	Avaliação da temperatura em um processo de fermentação semissólida para produção de poligalacturonases	28
1.7.2	Melhor condição do processo de fermentação semissólida para produção de poligalacturonases usando bagaço de caju	34
1.7.2.1	Cinética fermentativa	36
1.7.2.2	Influência da umidade, concentração de esporos, concentração de sulfato de amônio e temperatura sobre a atividade poligalacturonásica	41
 Capítulo 2 – Ampliação de escala do processo fermentativo		
2.1	Biorreatores utilizados na FSS	52
2.2	Reator bandeja	54
2.3	Materiais e métodos	55
2.3.1	Bagaço seco do pedúnculo de caju	56
2.3.2	Análises físico-químicas para caracterização do bagaço seco do pedúnculo de caju	56
2.3.3	Processo fermentativo	56

2.3.3.1	Planejamento experimental: otimização do processo de produção de poligalacturonases usando reator bandeja	57
2.3.4	Extração enzimática e determinação da atividade poligalacturonásica	59
2.4	Resultados e discussão	59
2.4.1	Ensaio preliminar: comportamento de algumas propriedades em um processo de fermentação semissólida	59
2.4.2	Variação da massa de fermentado em processo de fermentação semissólida	65
2.4.3	Otimização do processo de produção de poligalacturonases usando reator bandeja	69
Capítulo 3 – Estabilidade enzimática		
3.1	As enzimas e os efeitos da temperatura e pH	77
3.2	Estado da arte	78
3.3	Materiais e métodos	78
3.3.1	Fermentação, extração e atividade poligalacturonásica	79
3.3.2	Termoestabilidade enzimática	79
3.3.3	Estabilidade com relação ao pH	79
3.3.4	Tempo de estabilidade	80
3.4	Resultados e discussão	80
Capítulo 4 – Extração de poligalacturonases com água		
4.1	Extração de pectinases após processo de fermentação semissólida	85
4.2	Estado da arte: extração enzimática com água	87
4.3	Materiais e métodos	88
4.3.1	Processo fermentativo	88
4.3.2	Extração enzimática e atividade poligalacturonásica	88
4.3.3	Planejamento experimental 2 ³ + DCCR: extração com água	88
4.4	Resultados e discussão	90

Capítulo 5 – Aplicação do extrato enzimático bruto na clarificação do suco de maracujá		
5.1	Sucos de frutas tropicais	96
5.2	Maracujá: fruta e derivados	96
5.3	Clarificação de sucos de frutas	97
5.4	Materiais e métodos	100
5.4.1	Processo fermentativo	100
5.4.2	Extração de enzimas	100
5.4.3	Obtenção do suco de maracujá	100
5.4.4	Caracterização do suco <i>in natura</i>	101
5.4.4.1	Pectina em líquidos	101
5.4.4.2	Acidez total	102
5.4.5	Tratamento enzimático do suco	102
5.4.5.1	Planejamento experimental: melhor condição para o tratamento enzimático	103
5.5	Resultados e discussão	104
5.5.1	Caracterização do suco de maracujá <i>in natura</i>	104
5.5.2	Melhor condição para o tratamento enzimático	106
	Conclusões	112
	Referências bibliográficas	114
	Anexo	126

LISTA DE ABREVIATURAS

θ	Rotação do shaker
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
AR	Açúcares redutores
ART	Açúcares redutores totais
AT	Acidez total
C	Espessura da camada de substrato no reator bandeja
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D	Densidade aparente
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DNS	ácido 3,5-dinitro salicílico
E	Quantidade de esporos inoculados
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMPASA	Empresa de Abastecimento de Serviços Agrícolas
FSm	Fermentação submersa
FSS	Fermentação semissólida
gl	Grau de liberdade
HPLC	High performance liquid chromatography
L	Limpidez do suco de fruta
LAPPA	Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas
LCC	Líquido da castanha de caju
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
MQ	Média quadrática
N	Concentração de sulfato de amônio
PG	Atividade poligalacturonásica
PG _{máx}	Atividade poligalacturonásica máxima em um tempo de fermentação
Prod	Produtividade
QP	Quantidade de pectina
R ²	Coefficiente de determinação
R	Razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido
SQ	Soma quadrática
SS	Sólidos solúveis

t	Tempo de incubação enzimática no processamento de suco de maracujá
T	Temperatura no processamento de suco de maracujá
T _b	Temperatura da fermentação em reator bandeja
t _e	Tempo de contato durante extração com água
T _f	Temperatura de incubação da fermentação em escala bancada
U	Umidade inicial do meio
UAEQ	Unidade Acadêmica de Engenharia Química
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
V _e	Volume de enzimas adicionado ao suco de maracujá durante seu processamento

LISTA DE TABELAS

1	Curva padrão para análise de proteína bruta	21
2	Níveis das variáveis para melhor condição da fermentação em escala bancada	25
3	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^4	26
4	Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju	29
5	Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju utilizado na melhor condição da fermentação em escala bancada	35
6	Modelos empíricos para a atividade poligalacturonásica em cada tempo de fermentação	42
7	Maiores atividades poligalacturonásicas obtidas para 21, 29 e 54 horas: condições de cultivo e produtividade	43
8	Análise de variância para a equação correspondente a 21 horas de fermentação	43
9	Análise de variância para a equação correspondente a 29 horas de fermentação	43
10	Análise de variância para a equação correspondente a 54 horas de fermentação	44
11	Níveis das variáveis para ampliação de escala em reator bandeja	58
12	Matriz do planejamento fatorial $2^2 + DCCR$	58
13	Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju utilizado na avaliação da fermentação em biorreator bandeja	60
14	Caracterização físico-química dos bagaços utilizados na variação da influência da quantidade de meio	65
15	Modelos empíricos para a atividade poligalacturonásica em cada tempo de fermentação usando biorreator bandeja	70
16	Maiores atividades poligalacturonásicas obtidas para 45 e 69 horas: condições e produtividade	70
17	Análise de variância para a equação correspondente a 45 horas de	71

	fermentação em biorreator bandeja	
18	Análise de variância para a equação correspondente a 69 horas de fermentação em biorreator bandeja	71
19	Níveis das variáveis para extração enzimática	89
20	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 + DCCR	90
21	Análise de variância para a Equação 9	91
22	Níveis das variáveis para processamento do suco de maracujá	103
23	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3	104
24	Caracterização do suco de maracujá amarelo	105
25	Modelos empíricos para as respostas no processo de aplicação de enzimas em suco de maracujá	108
26	Análise de variância para a equação da limpidez	108

LISTA DE FIGURAS

1	Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.) (ALCÂNTARA, 2008)	09
2	Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju	29
3	Comportamento cinético no meio de cultivo	30
4	Comportamento cinético do pH	30
5	Comportamento cinético da concentração de açúcares redutores	31
6	Comportamento cinético da atividade poligalacturonásica	32
7	Fermentado após 45 horas de fermentação a 25°C	33
8	Fermentado após 45 horas de fermentação a 30°C	33
9	Fermentado após 45 horas de fermentação a 35°C	33
10	Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju	36
11	Cinética fermentativa do ensaio 1 (U = 30 %b.u, E = 10 ⁶ esporos/g, N = 0,5 %m/m, T _f = 25°C)	37
12	Cinética fermentativa do ensaio 7 (U = 30 %b.u, E = 10 ⁸ esporos/g, N = 1,5 %m/m, T _f = 25°C)	38
13	Cinética fermentativa do ensaio 14 (U = 50 %b.u, E = 10 ⁶ esporos/g, N = 1,5% _{m/m} , T _f = 35°C)	39
14	Cinética fermentativa do ensaio 16 (U = 50 %b.u, E = 10 ⁸ esporos/g, N = 1,5 %m/m, T _f = 35°C)	39
15	Cinética fermentativa da atividade poligalacturonásica para os ensaios 17 a 23	40
16	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 21 horas de fermentação	45
17	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 29 horas de fermentação	46
18	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 54 horas de fermentação	47
19	Gráfico de Pareto para 21 horas de fermentação	48
20	Gráfico de Pareto para 29 horas de fermentação	48
21	Gráfico de Pareto para 54 horas de fermentação	49

22	Esquema de um biorreator bandejas (COUTO & SANROMÁN, 2006)	52
23	Esquema de um biorreator de leito empacotado com entrada de ar úmido (COUTO & SANROMÁN, 2006)	53
24	Esquema de um biorreator do tipo tambor horizontal com entrada de ar úmido e agitação mecânica (COUTO & SANROMÁN, 2006)	53
25	Esquema de um biorreator de leito fluidizado com entrada de ar úmido e agitação pneumática (COUTO & SANROMÁN, 2006)	54
26	Biorreator tipo bandeja com meio de cultivo	57
27	Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju	61
28	Comportamento da umidade ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio	61
29	Comportamento do pH ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio	62
30	Comportamento da concentração de açúcares redutores (AR) ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio	62
31	Comportamento da atividade poligalacturonásica (PG) ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio	63
32	Aspecto da fermentação em reator bandeja	64
33	Comportamento da umidade ao longo de um processo fermentativo com variação de massa	66
34	Comportamento do pH ao longo de um processo fermentativo com variação de massa	67
35	Comportamento da concentração de açúcares redutores ao longo de um processo fermentativo com variação de massa	67
36	Comportamento da atividade poligalacturonásica ao longo de um processo fermentativo com variação de massa	68
37	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 45 horas de fermentação usando biorreator bandeja	72
38	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 69 horas	73

	de fermentação usando biorreator bandeja	
39	Gráfico de Pareto para 45 horas de fermentação em biorreator bandeja	74
40	Gráfico de Pareto para 69 horas de fermentação em biorreator bandeja	74
41	Termoestabilidade da enzima poligalacturonase	80
42	Estabilidade da enzima poligalacturonase em relação ao pH	81
43	Estabilidade da enzima poligalacturonase em função do tempo	82
44	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica: influência do tempo de contato (t_e) e da rotação do shaker (θ)	92
45	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica: influência do tempo de contato (t_e) e da razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido (R)	92
46	Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica: influência da razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido (R) e rotação do shaker (θ)	93
47	Gráfico de Pareto para extração enzimática com água	93
48	Superfícies de resposta para limpidez do suco de maracujá	109
49	Aplicação do extrato enzimático bruto no suco de maracujá <i>in natura</i> , suco após tempo de contato com a enzima e suco filtrado (da esquerda para a direita)	110
50	Gráfico de Pareto para limpidez do suco de maracujá	110

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de pectinases, usando o pedúnculo seco de caju (*Anarcadium occidentale* L.) como substrato e *Aspergillus niger* CCT0916 como microrganismo, visando à ampliação de escala do processo fermentativo e a aplicação do extrato enzimático no processo de produção de sucos de frutas tropicais. Para tanto, fez-se necessária a verificação da influência sinérgica de vários fatores no processo de fermentação, em escala de bancada. Assim, verificou-se a influência da quantidade de esporos inoculados, a umidade inicial do meio, a concentração de uma fonte de nitrogênio, e a temperatura, tendo como resposta a máxima atividade enzimática. A maior atividade poligalacturonásica (33,27U/g) foi encontrada com 50 %(b.u) de umidade inicial, 10^6 esporos por grama de meio úmido, 1,5 %(m/m) de sulfato de amônio e 35°C às 29 horas de fermentação. Os modelos para as 21, 29 e 54 horas de fermentação foram considerados estatisticamente significativos com 95% de confiança. Observou-se que a umidade possui maior influência no processo, tendo influência positiva em todos os tempos de fermentação. Analisou-se também a influência da espessura da camada de meio sólido e da temperatura de fermentação, através do processo de fermentação semissólida, usando um biorreator tipo bandeja. A maior atividade poligalacturonásica observada (15,72 U/g) foi obtida com 40 mm de espessura da camada de meio e temperatura de 23°C, às 69 horas de fermentação. Os modelos para as 45 e 69 horas de fermentação foram estatisticamente significativo para 95% de confiança. A temperatura é a variável que mais influencia o processo. Estudou-se a estabilidade da enzima poligalacturonase com relação à temperatura e ao pH, visando a posterior aplicação do complexo enzimático na redução da viscosidade e aumento da limpidez de sucos de frutas tropicais. A temperatura ótima de estabilidade da enzima foi 40°C. O pH ótimo encontra-se entre 2,5 e 3,5. Com até 30 minutos de exposição à temperatura e pH ótimos, a enzima se manteve com 90% de sua atividade. Após a fermentação através do processo semissólido, é necessária a extração da enzima do bolo fermentado. Assim, realizou-se estudo da extração da enzima poligalacturonase, usando água como solvente. A maior atividade poligalacturonásica 6,89 U/g foi obtida sob as condições de tempo 45 min, rotação do shaker 150 rpm e razão de solvente/massa de meio fermentado igual a 5 mL/g, caracterizando 35% a mais de recuperação. Os fatores que mais influenciaram o

processo foram o tempo de contato e a rotação do shaker. Aplicou-se o extrato enzimático obtido por fermentação semissólida no suco tropical de maracujá, observando a variação de alguns parâmetros importantes para conservação da qualidade do mesmo. As características do suco *in natura* variam com relação ao reportado na literatura, uma vez que depende da época da colheita do fruto, fenômenos e práticas agrícolas, etc. Quanto a verificação da influência dos fatores sobre o processo de aplicação enzimática no suco, sob as condições de temperatura igual a 50°C, tempo de contato de 20 min e volume de enzima igual a 0,05 %(v/v), ocorreu a maior redução da quantidade de pectina, cerca de 95%. Não houve variação na acidez total e pH do suco após a hidrólise enzimática. Apenas o modelo empírico para a limpidez foi significativo com 95% de confiança, tendo a temperatura de hidrólise como fator que mais influenciou o processo. O menor valor de absorvância para a limpidez 0,04 foi alcançado sob as condições: temperatura de 30°C, tempo de contato de 20 min e volume de enzima igual a 0,15 %(v/v), correspondendo a uma redução de 98% da limpidez do suco *in natura*.

Palavras-chaves: poligalacturonase, biorreator bandeja, suco de maracujá

ABSTRACT

Objective of this work is to study the pectinases production, using cashew apple dry bagasse (*Anarcadium occidentale* L.) as substrate and *Aspergillus niger* CCT0916 as microorganism, aiming to increase the scale of fermentation process and enzyme extract application in production process of tropical fruit juices. Therefore, it was necessary to verify the synergistic influence of various factors on fermentation process laboratory scale. Thus, it was found to influence the amount of spore inoculated, initial moisture content of the medium, nitrogen source concentration and temperature, in response to maximal enzyme activity. The highest polygalacturonase activity (33.27 U/g) was found with 50 %(w.b.) initial moisture, 10^6 spores per gram of wet medium, 1.5 %(m/m) of ammonium sulfate and 35°C at 29 hours of fermentation. The models for 21, 29 and 54 hours of fermentation were considered statistically significant at 95% confidence. It was noted that humidity has a greater influence on process, having a positive influence on all fermentation times. It was also analyzed the influence of solid medium thickness and fermentation temperature, through solid state fermentation process using a tray bioreactor. The higher polygalacturonase activity observed (15.72 U/g) was obtained with 40 mm thick layer of medium and temperature of 23°C at 69 hours of fermentation. Models for 45 and 69 hours of incubation were statistically significant to 95% confidence level. Temperature is the variable that most influences the process. It was studied the stability of the enzyme polygalacturonase in relation to temperature and pH in order to further application of enzymatic complex in viscosity reduction and increase the clarity of tropical fruit juices. Optimum temperature stability of polygalacturonase enzyme was 40°C. Optimum pH is between 2.5 and 3.5. With up to 30 minutes of exposure to the optimum temperature and pH, enzyme remained at 90% of its activity. After fermentation by the solid state process, it is necessary to extract the enzyme from fermented cake. Thus, a study was conducted of polygalacturonase enzyme extraction, using water as solvent. The highest activity poligalacturonase 6.89 U/g was obtained under conditions of time equal to 45 minutes, rotating shaker equal to 150 rpm and ratio of solvent/mass of fermented medium equal to 5 mL/g, characterizing 35% more recovery. Factors that most influenced the process were contact time and shaker rotation. It was applied the enzyme extract obtained by solid state fermentation in

tropical passion fruit juice, observing the variation of some important parameters to keep the quality. Characteristics of fresh juice vary with respect to that reported in literature, it depends on the time of harvest fruit, phenomena and agricultural practices, etc. As for checking the factors influence on process, the best results to reduction of pectin amount, about 95%, were under conditions of temperature 50°C, contact time 20 min and amount of enzyme equal to 0.05 %(v/v). There was no change in the total acidity and pH of juice after enzymatic hydrolysis. Only the empirical model for the clarity was significant with 95% confidence, taking hydrolysis temperature as a factor that influenced the process. The lowest absorbance for clarity 0.04 was achieved under the conditions: 30°C, contact time 20 min and amount of enzyme equals 0.15 %(v/v), corresponding to a reduction 98% of fresh juice clarity.

Keywords: polygalacturonase, tray bioreactor, passion fruit juice.

INTRODUÇÃO

A fermentação semissólida (FSS) é definida como um processo que ocorre sobre um material não solúvel, atuante como suporte e fonte de nutrientes, com quantidade reduzida de água, sob a ação de um agente fermentador (COUTO & SANROMÀN, 2006).

Embora haja numerosos projetos para fermentadores industriais, observa-se um desenvolvimento limitado de fermentadores para processos usando fermentação semissólida. Isto ocorre devido há algumas limitações do processo, tais como a dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano, a heterogeneidade da mistura na fermentação, que dificulta o controle do crescimento celular e de variados parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração, concentração de nutrientes e produtos, tornando complicado o controle e automação desse processo (SANTOS, 2007).

Apesar das dificuldades, o uso de meio semissólido pode ser vantajoso na FSS, pois permite a utilização de resíduos agroindustriais (farelos, cascas e bagaços) como substrato, o que representa matéria-prima abundante e de baixo custo no Brasil.

Diversos resíduos industriais têm sido utilizados na produção de bioprodutos, através de processos fermentativos. Dentre esses resíduos pode-se citar o pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.), que é rico em açúcares, ácidos orgânicos e fibras, sendo esta a razão pela qual tem sido utilizado na produção de fenóis (MICHODJEHOUN-MESTRES et al., 2009), bioetanol (ROCHA et al., 2008), vinho de caju (TORRES NETO et al., 2006), enriquecimento protéico (CAMPOS et al., 2005), pectinases (SANTOS, 2007; ALCÂNTARA, 2008), celulasas, entre outros.

As pesquisas citadas têm o intuito de minimizar o desperdício gerado pela indústria da castanha quanto ao descarte desse pedúnculo, já que apenas 10% do mesmo são aproveitados sob a forma de produtos alimentícios (OLIVEIRA & IPIRANGA, 2009).

Estando entre as enzimas mais aplicadas industrialmente, as pectinolíticas foram às pioneiras na preparação de vinhos e sucos de frutas. Assim, estas enzimas também são utilizadas na recuperação de óleos essenciais e extração de óleos vegetais, produção de ketchup, melhoramento na extração do amido da mandioca, fermentação de café e chá, indústrias têxtil, papel e celulose, entre outras aplicações (UENOJO & PASTORE, 2007).

Na fabricação de suco de fruta, as substâncias pécticas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência, e sua presença causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração. A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (UENOJO & PASTORE, 2007).

Assim, faz-se necessário o aproveitamento do pedúnculo de caju, observando-se que a sua utilização em processo de fermentação semissólida para produção de pectinases propiciará a sua valorização e promoverá uma destinação para estes resíduos, que dispensará processos de descarte.

Como continuação dos trabalhos desenvolvidos por Alcântara (2008), este projeto visa à otimização e ampliação de escala do processo fermentativo usando bagaço seco do pedúnculo de caju como meio semissólido e a posterior aplicação do extrato enzimático no processamento de sucos de frutas tropicais, tendo este aprovação pelo edital 70/2008 do CNPq.

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos: o Capítulo 1, trata da determinação da melhor condição para o processo de fermentação semissólida em escala de bancada, visando introduzir os conceitos iniciais da pesquisa, como o de fermentação semissólida e suas variáveis mais importantes; o Capítulo 2 refere-se à ampliação de escala do processo de FSS usando o reator tipo bandeja, avaliando variáveis pertinentes a esta configuração; no Capítulo 3 foi caracterizada a estabilidade enzimática com relação à temperatura e ao pH do extrato obtido na fermentação em biorreator bandeja; o Capítulo 4 contempla a extração do complexo enzimático utilizando água destilada como solvente; e o Capítulo 5 mostra a aplicação do extrato enzimático no processamento do suco de maracujá e a avaliação de alguns parâmetros deste processo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a produção de pectinases, usando o pedúnculo seco de caju (*Anarcadium occidentale* L.) como substrato e *Aspergillus niger* CCT0916 como microrganismo, visando a ampliação de escala do processo fermentativo e a aplicação do extrato enzimático no processo de produção de sucos de frutas tropicais.

Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o substrato bagaço seco do pedúnculo de caju (pH, densidade aparente, resíduos minerais, umidade, concentração de sólidos totais (°Brix), açúcares redutores totais, açúcares redutores, quantidade de pectina, proteína bruta e distribuição granulométrica);
- Descobrir a melhor condição do processo de fermentação semissólida em escala de bancada para produção de pectinases usando o pedúnculo de caju seco como substrato e como agente da fermentação *Aspergillus niger* CCT0916, verificando a influência da quantidade de esporos inoculados, umidade inicial do meio, concentração de uma fonte de nitrogênio, e temperatura, tendo como resposta a atividade poligalacturonásica;
- Realizar ampliação de escala do processo de fermentação semissólida para produção de pectinases, usando biorreator do tipo bandeja;
- Estudar a estabilidade do complexo pectinolítico com relação às variáveis pH e temperatura;
- Obter extrato enzimático usando água como solvente na extração;
- Aplicar o complexo enzimático na clarificação de sucos de frutas tropicais.

Capítulo 1

Melhor condição da fermentação semissólida em escala de bancada

Vários fatores são importantes para o bom desenvolvimento de um processo de fermentação semissólida. Os mais críticos são: a quantidade de água disponível para o microrganismo se desenvolver e produzir o bioproduto desejado; a temperatura, devido ao aumento do calor gerado pelo metabolismo microbiano; e o meio de cultivo, pois o microrganismo necessita de nutrientes para seu desenvolvimento e de um indutor para produção enzimática. Faz-se necessária a verificação da influência sinérgica de todos esses fatores no processo. Assim, este capítulo tem como objetivo determinar a melhor condição do processo de fermentação semissólida, em escala de bancada, para produção de poligalacturonases, usando o pedúnculo seco de caju como substrato e como agente da fermentação o *Aspergillus niger* CCT0916, verificando a influência da quantidade de esporos inoculados, umidade inicial do meio, concentração de uma fonte de nitrogênio, e temperatura, tendo como resposta a máxima atividade enzimática.

1.1 – Fermentação semissólida (FSS)

A FSS apresenta as seguintes características (PINTO et al., 2006):

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas;
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas;
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas aos do habitat natural;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

Estudos da produção de enzimas por fungos na FSS têm mostrado repetidamente que esta, em comparação com a fermentação submersa (FSm), é menos propensa a problemas com inibição do substrato e produz enzimas com alta estabilidade quanto à temperatura e ao pH; o tempo de fermentação pode ser menor em relação aos encontrados na literatura e a degradação das enzimas por proteases é minimizada (HÖLKER et al., 2004).

Além disso, Hesseltine (1972) acrescenta outras vantagens como, por exemplo, simplicidade no preparo do meio de fermentação, uma vez que se necessita normalmente apenas do ingrediente principal e de água para umedecimento; possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima; e maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado, barateando as normalmente onerosas etapas de *downstream processing*.

As vantagens ecológicas da FSS refletem o fato de que os processos são conduzidos sem excesso de água livre, o que resulta no consumo mínimo de água, baixa produção de água efluente e eliminação da necessidade do uso de agentes anti-espumantes.

Outro aspecto favorável da FSS é que, em muitos casos, podem ser usados resíduos agrícolas como fonte de carbono e energia (DEL BIANCHI et al., 2001; HÖLKER et al., 2004; PINTO et al., 2006).

Por outro lado, as maiores desvantagens são as dificuldades no monitoramento e controle dos parâmetros da fermentação, como o conteúdo de biomassa, pH, temperatura, umidade e dificuldades na manutenção da temperatura e umidade especialmente em larga escala (HAMIDI-ESFAHANI et al., 2004).

Um fator bastante importante na produção de pectinases através da fermentação semissólida é a composição do meio de cultivo. O balanço apropriado entre as fontes de nitrogênio é tão importante para o requerimento nutricional do microrganismo quanto os efeitos das condições do ambiente, que afetam o crescimento micelial (RAIMBAULT et al., 1977).

A água presente no sistema é um fator importantíssimo. Essa quantidade de água está relacionada com o meio através da umidade, que diz respeito à percentagem de água na massa total do meio. A determinação do seu valor no processo está intimamente relacionada com a natureza do substrato, às necessidades do microrganismo utilizado e ao tipo de produto final desejado (DEL BIANCHI et al., 2001; PINTO et al., 2006).

Segundo Del Bianchi et al. (2001), se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do substrato e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e, conseqüentemente, no decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, principalmente, a bacteriana. Para níveis de umidade menores que o necessitado pelo microrganismo, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um menor crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, uma menor produção do produto desejado.

Assim como a umidade, a temperatura também é considerada um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado durante a fermentação, que afeta diretamente a germinação dos microrganismos e a formação do produto. No processo de compostagem, este efeito é desejável, porém, para processos biotecnológicos, como a produção de enzimas, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (DEL BIANCHI et al., 2001; PINTO et al., 2006).

1.2 – Pectinases

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes e desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Porém, os fungos são os preferidos em escala industrial, já que cerca de 90% das enzimas produzidas por eles, podem ser secretadas no meio, além de produzirem grandes quantidades (BLANDINO et al., 2001; LARA-MÁRQUEZ et al., 2011).

As enzimas pécticas sozinhas são responsáveis por um quarto da produção de enzimas alimentícias no mundo (GOMES et al., 2011). Estas são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir a viscosidade, melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação (ALKORTA et al., 1998), e no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais, na extração de polpa de tomate; no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxteis e de papel; entre outras aplicações (UENOJO & PASTORE, 2007).

A classificação das pectinases está baseada no ataque a estrutura galacturônica da molécula da substância péctica. Basicamente, existem três tipos de enzimas (ALKORTA et al., 1998; UENOJO & PASTORE, 2007):

- pectina esterase, que remove os grupos metil éster;
- pectinases (hidrolases e liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas;
- protopectinases, que solubilizam protopectina para formar pectina.

As poligalacturonases são enzimas pectinolíticas que catalisam a quebra da cadeia de ácido poligalacturônico com a introdução da água através de pontes de hidrogênio. Estas enzimas têm aplicações tecnológicas, funcionais e biológicas no processamento de alimentos e nas interações fungo-planta.

As poligalacturonases envolvidas na hidrólise das substâncias pécticas são as endo-poligalacturonases e exo-poligalacturonases. As exo-poligalacturonases atuam nos monômeros terminais do ácido poligalacturônico, produzindo ácido monogalacturônico.

As endo-poligalacturonases atuam randomicamente sobre o ácido poligalacturônico, produzindo ácido oligogalacturônico (ABBASI et al., 2011).

Segundo Antier et al. (1993), industrialmente, as pectinases são produzidas tanto pela FSm quanto pela FSS com linhagens de *Aspergillus niger* CH4, porém, a FSS é geralmente considerada a técnica mais suscetível a rendimentos maiores de pectina esterase e poligalacturonases. Uenojo e Pastore (2007) explicam que esta preferência ocorre, porque a FSS permite a produção de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação.

1.3 – Caju

O cajueiro encontra-se disperso em uma larga faixa tropical do mundo. Ele é cultivado em 26 países e os maiores produtores, responsáveis por 81% da produção mundial, são: Índia, Brasil, Vietnã, Tanzânia, Indonésia, Moçambique e Guiné-Bissau. Na região Nordeste do Brasil, concentra-se 99% da área de colheita e da produção nacional, contribuindo para a criação de 16 mil empregos na zona urbana (unidades beneficiadoras) e 300 mil no meio rural (FERREIRA & DUARTE, 2003).

O principal produto do caju (Figura 1) é a castanha, que é bastante conhecida pelo mundo. A amêndoa, no seu interior, é a parte comestível e o mesocarpo contém um líquido viscoso, sumamente cáustico, de cor quase negra e sabor picante, conhecido como LCC (Líquido da Castanha do Caju), que contém o ácido anacárdico (90%) e dois fenóis (10%) ou cardol. O suco é processado do pseudofruto, que é considerado um resíduo pela indústria da castanha. Este pseudofruto tem estrutura carnosa e é muito suculento (MOURA, 2001).



Figura 1 – Caju (*Anacardium occidentale* L.) (ALCÂNTARA, 2008)

O consumo do pseudofruto fresco ainda é limitado apesar do suco ser amplamente aceito pela população. Contudo, o Brasil produz aproximadamente 1,9 milhão de ton/ano de caju, e do pseudofruto explorado, os números alcançados foram de 10% do total produzido (OLIVEIRA & IPIRANGA, 2009).

O pedúnculo do caju *in natura* torna-se um produto altamente perecível, porque possui uma casca muito frágil, o que dificulta o seu manuseio e transporte das áreas de produção aos mercados de consumo ou a indústria. Sobre sua casca existe uma mucilagem na qual se fixam os fungos, dando-lhes condições propícias para seu desenvolvimento, que é ainda favorecido quando as condições de temperatura e umidade forem elevadas nas regiões produtoras (MOURA et al., 2004).

O pedúnculo pode ser utilizado na fabricação dos mais variados doces e bebidas. O suco fresco, clarificado, engarrafado e cozido em banho-maria, dá a cajuína, bebida refrescante, saborosa, semelhante ao suco de maçã clarificado, produto natural sem aditivos químicos. O suco clarificado pode ser utilizado na fabricação de refrigerante, semelhante ao guaraná ou, ainda, ser concentrado com açúcar, transformando-se no xarope de caju.

Do suco de caju, também podem ser produzidos vinho, vinagre, aguardente e licores. Porém, o derivado do pedúnculo de maior importância econômica é o suco integral industrializado, de grande aceitação no mercado nacional, o qual precisa ser diluído e adoçado para o consumo. Encontra-se também no mercado o suco pronto para beber, geralmente em embalagem longa vida, denominado néctar de caju.

Segundo Oliveira e Ipiranga (2009), atualmente, ações estão sendo implementadas visando o desenvolvimento de tecnologias e processos que possibilitem o aproveitamento integral do caju. Sobressaem-se as ações voltadas para o desenvolvimento de produtos diferenciados com boa agregação de valor, tornando o processamento do pedúnculo do caju uma oportunidade de aumento de renda e redução nos custos de produção dos pequenos produtores. Uma das formas de promover essa agregação é a produção de enzimas, já que estas possuem grande valor comercial.

Uma das enzimas mais importantes em processos industriais é a pectinase. Atualmente, essa enzima corresponde a cerca de 25% do mercado mundial de enzimas. O valor estimado de vendas em 1995 foi de US\$ 1 bilhão, dos quais US\$ 75 milhões somente com pectinases (KASHYAP et al., 2001).

Alcântara e Silva (2011) objetivaram a produção de pectinases usando o pedúnculo seco de caju como meio e o *Aspergillus niger* CCT0916 como microrganismo, em um processo de fermentação semissólida. Os maiores valores de atividade enzimática foram 33 U/g. Constatou-se que o bagaço seco do pedúnculo de caju é um substrato competitivo perante outros descritos na literatura.

Outra enzima bastante importante em processos industriais, a celulase é utilizada na indústria têxtil e de papel e celulose. Atualmente, possui grande destaque no processo de produção de bioetanol, sendo utilizada na etapa de hidrólise de substratos celulósicos.

Guedes et al. (2010) produziram celulase, em cultura submersa, utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei* ATCC 2768, usando como substrato bagaço do pedúnculo do caju e bagaço de coco. Os bagaços foram fermentados após três condições: (1) sem pré-tratamento, (2) pré-tratamento com NaOH (1 M) e (3) com explosão de alta pressão. Os resultados mostraram que o microrganismo apresentou melhor produção de celulase na cultura contando bagaço do pedúnculo de caju tratado com NaOH (2,16 IU/mL de CMCase e 0,21 IU/mL FPase). A melhor produção de celulase em bagaço de coco foi usando tratamento com NaOH (0,48 IU/mL de CMCase e 0,07 IU/mL de FPase), contudo, as atividades obtidas foram menores que as obtidas na fermentação do bagaço de caju. Sendo assim, observa-se que o bagaço do pedúnculo de caju é um indutor em potencial para síntese de enzimas celulolíticas.

1.4 – *Aspergillus niger*

Os *Aspergillus* são largamente espalhados na natureza, sendo encontrados em frutas, vegetais e outros substratos capazes de fornecer o alimento necessário ao seu crescimento, estando algumas espécies envolvidas na deterioração de alimentos. Os *Aspergillus* crescem na presença de altas concentrações de açúcar e de sal, indicando que podem extrair água de substâncias relativamente secas (PELCZAR et al., 1980).

Segundo Schuster et al. (2002), os *Aspergillus niger* são um dos mais importantes microrganismos usados na biotecnologia. Estes fungos são intensivamente usados para produção de enzimas e ácido cítrico.

O *A. niger* foi usado industrialmente à primeira vez para produção de ácido cítrico por fermentação em 1919. Além de ácido cítrico, *A. niger* é usado para produção das mais diversas enzimas. Pectinase, protease e amiloglicosidase foram as primeiras a serem exploradas e foram originalmente cultivadas em cultura superficial. Em 1932, surgiram as primeiras pesquisas que mostraram que esse fungo também poderia ser cultivado em cultura submersa.

A partir de 1950, a produção tecnológica por fungos foi gradualmente sendo substituída para a cultura submersa e, várias outras enzimas, com a celulase e a hemicelulase, foram produzidas usando-se as linhagens de *Aspergillus*.

1.5 – Estado da arte: concentração de inóculo, fonte de nitrogênio, umidade e temperatura

Taragano e Pilosof (1999) estudaram o efeito temporal das variáveis pH e atividade de água e sua interação na produção de enzimas pectinolíticas, através de FSS. Foi estudada a condição ótima para obtenção de um preparado com maior atividade pectinaliase e baixa atividade pectinaesterase, aplicando um planejamento Doehlert e a metodologia de superfície de resposta. O microrganismo utilizado foi o *Aspergillus niger* 148. O substrato empregado foi o farelo de trigo, com massa de meio igual a 5 g em base seca, suplementado com 1% de pectina cítrica. A fermentação iniciou-se com 35 % (b.u) de umidade. A concentração inicial de esporos foi fixada em 10^6 conídios/g de farelo seco,

e então, o meio foi incubado a 28°C. Com a realização dos experimentos, observou-se que com a atividade de água e pH, respectivamente, 0,93-0,94 e 6,5-7,0, é possível obter um extrato contendo principalmente pectinálise com concentração de aproximadamente 0,25 g/L.

Castilho et al. (2000) empregaram soja e farelo de trigo (proporção 1:1) para a produção e extração de pectinases, usando *A. niger*, através da fermentação semissólida. O meio foi suplementado com 1,35% (NH₄)₂SO₄ e 0,55 % (m/m) HCl. Estes autores variam a umidade inicial do meio sob os seguintes valores: 25, 40, 55 e 70 % (m/m). Os experimentos foram realizados em escala bancada, com massa de meio igual a 10 g de substrato sólido. Foram inoculados 10⁸ esporos por grama de substrato sólido. A temperatura de fermentação utilizada pelos autores correspondeu a 30°C. A maior atividade poligalacturonásica obtida (≈ 25 U/mL) foi alcançada com umidade inicial igual a 40%.

Santos (2007) estudou o efeito inicial da umidade e adição de sulfato de amônio e fosfato de potássio na produção de poligalacturonases por fermentação semissólida, usando pedúnculo de caju como substrato e *Aspergillus niger* CCT0916 como microrganismo fermentador, usando 10 g em base úmida. A melhor condição de produção foi umidade inicial do meio de 40 % (b.u.), 1 % (m/m) de sulfato de amônio e sem a adição de fosfato de potássio, resultando em atividade poligalacturonásica de 10,1 U/g de meio fermentado, usando concentração de inóculo de 10⁷ esporos por grama de substrato sólido e temperatura de incubação igual a 30°C.

Alcântara (2008) estudou a produção de pectinases, usando pedúnculo de caju seco como meio e o *Aspergillus niger* CCT 0916 como microrganismo, em um processo fermentativo semissólido, verificando a influência da quantidade de água e uma fonte de nitrogênio, usando 10 g de meio úmido. A atividade poligalacturonásica máxima (11 U/g) foi obtida com atividade de água entre 0,99 e 1,00. A melhor condição para produção da atividade poligalacturonásica foi 50 % (b.u) de umidade inicial e 0,5 % (m/m) de sulfato de amônio, usando concentração de inóculo de 10⁷ esporos por grama de substrato sólido e temperatura de incubação igual a 30°C.

Diferentemente de Santos (2007), Alcântara (2008) obteve influência negativa da concentração de sulfato de amônio. A adição de uma fonte de nitrogênio, devido à alta

concentração proteica, provavelmente saturou o meio contendo microrganismos de forma a inibir a produção de enzimas. Vale salientar que a caracterização físico-química do substrato feita por Santos (2007) teve como resultado uma concentração de proteína igual a 6,83%, valor quase duas vezes inferior ao valor encontrado para o resíduo utilizado por Alcântara (2008).

Souza (2008) estudou o efeito da adição da fonte de nitrogênio e da umidade inicial no processo de fermentação semissólida para a produção de poligalacturonases, utilizando o resíduo seco do maracujá (albedo e casca) como substrato e o *Aspergillus niger* CCT 0916 com microrganismo fermentador, usando 10 g de meio úmido. Os melhores resultados obtidos para produção de poligalacturonases (20,9 U/g) foi com 40 % (b.u) de umidade e 1,0 % (m/m) de nitrogênio, usando concentração de inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato sólido e temperatura de incubação igual a 30°C.

Santiago et al. (2011) avaliaram o potencial da casca desidratada do umbu como substrato na produção de poligalacturonases, usando *A. niger* CCT 0916, através da fermentação semissólida, variando a umidade inicial do meio (40, 50 e 60 % (b.u)) e a concentração de sulfato de amônio (0,5, 1 e 1,5 % (m/m)), como fonte de nitrogênio. Foram utilizados 10 g de meio úmido como massa de meio. A temperatura de fermentação foi igual a 30°C. Observaram que a atividade poligalacturonásica máxima (15,65 U/g) foi obtida com umidade inicial de 50 % (b.u) e fonte de nitrogênio de 1 % (m/m), às 66 horas de fermentação.

1.6 – Materiais e métodos

As análises descritas neste trabalho foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica LEB/UAEQ, da Universidade Federal de Campina Grande – PB.

1.6.1 – Bagaço seco do pedúnculo de caju

O caju foi adquirido por duas vias: (1) cedido pela indústria de polpa de frutas FRUTNAT e (2) na Empresa de Abastecimento de Serviços Agrícolas (EMPASA), localizada em Campina Grande – PB.

Para o caju adquirido na EMPASA, as seguintes etapas foram realizadas para preparação do substrato:

- Recepção: o caju adquirido foi inicialmente lavado em água clorada, para retirada de microrganismos e sujeira. Em seguida, foi lavado em água corrente, para retirada do cloro. Após o processo de lavagem, foram retiradas as castanhas. Os pedúnculos foram triturados em liquidificador industrial, para extração do suco;
- Secagem: o bagaço do pedúnculo do caju úmido foi secado em estufa com circulação de ar a 55°C, em bandejas de alumínio forradas com plástico de polietileno;
- Trituração: o bagaço do pedúnculo do caju seco foi moído em moinho de facas da marca TECNAL, cedido pelo Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA/UFCG);
- Armazenamento: o bagaço do pedúnculo do caju seco em pó foi armazenado em saco plástico de polietileno a temperatura ambiente.

Para o bagaço cedido pela FRUTNAT, o procedimento de preparação do substrato foi realizado a partir da etapa de secagem.

A aquisição dos bagaços através de dois lugares distintos ocorreu, pois nenhuma das duas empresas cedeu bagaço suficiente, devido a grande quantidade de bagaço utilizada neste trabalho.

1.6.2 – Análises físico-químicas para caracterização do bagaço seco do pedúnculo de caju

1.6.2.1 – Granulometria

Aproximadamente 100 g do substrato foram pesados em balança analítica, sendo em seguida levados para o agitador de peneiras CONTENGO-PAVITEST durante 10 min, em jogo constituído por seis peneiras: 14 (1,18 mm), 20 (0,85 mm), 24 (0,71 mm), 35 (0,45 mm), 48 (0,30 mm), 60 (0,25 mm), segundo as recomendações da Associação

Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). O material retido em cada peneira foi pesado e o resultado foi expresso em percentual em relação à massa do material original.

1.6.2.2 – Densidade aparente

Aproximadamente 100 g do material foram pesados e colocados em uma proveta para determinar o volume ocupado, sem haver compactação.

$$\text{Densidade} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume ocupado (mL)}} \quad (1)$$

1.6.2.3 – pH

Foi preparada uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g da amostra sólida. Após homogeneização, esta suspensão foi filtrada através de algodão e foi medido o pH do filtrado em pHmetro digital previamente calibrado (BRASIL, 2005).

1.6.2.4 – Umidade

Amostras com peso de 2 a 10 g foram colocadas em cápsula de metal previamente seca e tarada. As cápsulas foram levadas para estufa a 105°C por 24 h. Depois de atingido o equilíbrio, estas amostras foram resfriadas em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente. Em seguida, foram pesadas (BRASIL, 2005).

A umidade das amostras foi calculada pela Equação 2.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{massa inicial da amostra} - \text{massa final da amostra})}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

1.6.2.5 – Cinzas

Amostras de 5 a 10 g do substrato foram colocadas em cadinhos de porcelana, previamente aquecidos em mufla a 550°C e resfriados em dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente. Estas foram carbonizadas em bico de Bunsen e incineradas em mufla a 550°C, até eliminação completa do carvão. A cinza apresentou cor branca ou ligeiramente acinzentada. Após a retirada das amostras da mufla, estas foram levadas ao dessecador com sílica gel até alcançar temperatura ambiente e, em seguida, foram pesadas (BRASIL, 2005).

A Equação 3 foi utilizada no cálculo da percentagem de cinzas do material.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (3)$$

1.6.2.6 – Sólidos solúveis (°Brix)

Foram adicionados 9 mL de água destilada a 1 g do resíduo, seguido de agitação até perfeita homogeneização. Após repouso por 30 min, a suspensão foi filtrada com algodão. A leitura do teor de sólidos solúveis foi feita em refratômetro. O resultado foi multiplicado por dez devido à diluição da amostra (BRASIL, 2005).

1.6.2.7 – Açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados usando 0,5 g da amostra pela metodologia do DNS (MILLER, 1959) em espectrofotômetro, modificada de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE) usando solução de glicose como padrão.

1.6.2.7.1 – Curva padrão para determinação da relação entre a concentração de açúcares redutores e absorbância

A curva padrão foi construída pesando 0,1 g de glicose e dissolvendo-o até 100 mL de água em balão volumétrico. Após homogeneização, foram transferidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e completado o volume para 10 mL com água destilada, sucedido de homogeneização. Com isso, a curva padrão foi construída dentro da faixa de concentração de açúcares entre 0,1 e 1 g/L.

De cada tubo, foi transferido 1 mL das soluções com concentrações de 0,1 a 1 g/L e adicionado mais 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). Estes tubos foram aquecidos em água em ebulição por 5 min, e então resfriados até temperatura ambiente. A cada tubo, foram adicionados 8 mL de água destilada. Após homogeneização, as amostras foram levadas para leitura no espectrofotômetro, onde foram lidas em absorbância de 540 nm. Com estes valores, a curva de absorbância em função da concentração foi construída.

1.6.2.7.2 – Análise da concentração de açúcares redutores nas amostras

Inicialmente foi determinado o volume de água destilada a diluir 0,5 g das amostras para que a leitura do espectrofotômetro estivesse dentro da faixa da curva padrão. As amostras ficaram em repouso por 30 min em água destilada e, em seguida, foram filtradas com papel filtro qualitativo. As diluições foram usadas no cálculo para a determinação do teor de açúcar da amostra.

Após diluição, 1 mL do filtrado foi transferido para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução de DNS. Em seguida, este tubo foi levado para banho com água fervente por 5 min. Após este intervalo, o tubo foi retirado do banho quente e levado ao banho de água fria por 5 min. 8 mL de água destilada foram adicionadas aos tubos e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os cálculos foram efetuados para expressar os resultados em gramas de açúcares redutores por 100 gramas de amostra inicial (g/100g).

$$AR(g/100g) = \frac{ABS \times f \times V}{m \times 10} \quad (4)$$

Em que: ABS = leitura do espectrofotômetro
 f = fator da curva padrão
 V = volume de água usado no preparo da diluição (mL)
 m = massa da amostra (g)
 10 = fator de conversão

1.6.2.8 – Açúcares redutores totais (ART)

O percentual de açúcares redutores totais (ART) das amostras foi determinado pelo método DNS, conforme metodologia adaptada por Correia (2004).

Para o preparo da amostra, determinou-se o volume de água destilada para diluição que resultou em leitura dentro da faixa da curva padrão. Em seguida, retirou-se 1 mL da diluição e acrescentou-se 1 mL de HCl 2 N. As amostras foram levadas à ebulição por 5 min e resfriadas. A solução foi neutralizada acrescentando 3 mL de NaOH 1 N.

A curva padrão para a determinação da concentração de açúcares redutores totais foi construída seguindo a metodologia adotada no item 1.6.2.7.1 deste trabalho. Assim como as análises realizadas para as amostras seguiram a metodologia descrita no item 1.6.2.7.2. Os cálculos para expressar os resultados em gramas de açúcares redutores totais por 100 gramas de amostra inicial (g/100g) foram efetuados de acordo com a Equação 5.

$$ART(g/100g) = \frac{ABS \times f \times fd \times V}{m \times 10} \quad (5)$$

Em que: ABS = leitura do espectrofotômetro
 f = fator da curva padrão
 fd = fator de diluição da amostra após o preparo
 V = volume de água usado no preparo da diluição
 m = massa da amostra (g)
 10 = fator de conversão

1.6.2.9 - Pectina

A fração de pectina das amostras foi determinada pelo método gravimétrico por precipitação com pectato de cálcio, previamente descrito por Rangana (1979).

Foram pesados 20 g da amostra em um Becker de 1000 mL e adicionados 400 mL de solução de HCl 0,05 N. Em seguida, foram levados ao aquecimento por 2 h, colocando água destilada perdida por evaporação. Após este período, esta solução foi resfriada até temperatura ambiente e transferida para uma proveta de 500 mL completando-se o volume com água destilada. Em seguida, foi filtrada com o auxílio de algodão. O filtrado foi medido em uma proveta de 200 mL e transferido para um Becker de 1000 mL. A esta mistura foram acrescentados 250 mL de água destilada. Esta solução foi neutralizada com solução de NaOH 0,1 N, com auxílio do pHmetro. Após neutralização, foram adicionados 10 mL de NaOH 1 N em excesso, com agitação constante. Em seguida, foi deixado em repouso por 15 h.

Após esse tempo, foram adicionados 50 mL de ácido acético 1 N e, após 5 min, acrescentaram-se 25 mL de solução de cloreto de cálcio 1 N com agitação. A solução foi levada à ebulição por 2 min e deixada em repouso por 3 h. Após esse período, esta solução foi filtrada com papel filtro, preparado antecipadamente.

O papel filtro foi molhado com água destilada e seco em estufa a 105°C por 2 h. Foi resfriado em dessecador com sílica gel e pesado.

O precipitado foi lavado com água destilada fervente até que este ficasse livre de cloretos. Para verificação da presença de cloretos na porção retida no papel filtro, foi feito o teste usando uma solução de nitrato de prata a 1%, onde foi acrescentado 1 mL dessa solução no filtrado. Estando o filtrado livre de cloretos, o líquido não deve se tornar turvo. O papel de filtro contendo o pectato de cálcio foi seco na estufa a 105°C até massa constante. A pectina foi expressa em percentagem de pectato de cálcio através da Equação 6.

$$\% \text{ pectato de cálcio} = \frac{\text{massa do pectato de cálcio} \times 500}{\text{mL do filtrado} \times \text{massa da amostra}} \times 100 \quad (6)$$

1.6.2.10 – Proteína bruta

Foi utilizado o método semi-micro Kjeldahl adaptado para nitrogênio por espectrofotometria para determinação da concentração de proteína bruta do resíduo do caju (LE POIDEVIN & ROBINSON, 1964). A análise foi feita em triplicata.

1.6.2.10.1 – Reativo de Nessler

Foram pesados 22,75 g de Hgl em um Becker e adicionada uma pequena quantidade de água. Em outro Becker, foram pesados 17,45 g de KI e adicionada água destilada para dissolução prévia. Mais uma vez, em outro Becker, foram pesados 56 g de KOH e dissolvido previamente em água destilada. Em seguida, foram misturadas as soluções de KI e Hgl, inicialmente. E depois, foi acrescentada a solução de KOH. Agitou-se até completa dissolução. Essa solução foi levada para aferição em balão volumétrico de 500 mL. Após tempo de resfriamento da solução (temperatura ambiente), a solução foi agitada em agitador magnético por 4 horas, sendo armazenada em frasco escuro com papel madeira.

Em um terceiro Becker, foram pesados 112 g de KOH. Estes foram dissolvidos em 200 mL de água destilada em banho com água fria. Após completa dissolução, e estando a solução em temperatura ambiente, foi adicionada a solução preparada anteriormente com agitação constante. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e aferida com água destilada. Após aferição, a solução foi levada para agitação em agitador magnético por 4 h, seguido de filtração. Por fim, esta solução foi armazenada em frasco escuro.

1.6.2.10.2 – Digestão sulfúrica

Foi pesada 0,1 g da amostra em tubos digestores. Foi acrescentado 0,5 g da mistura catalisadora (94 g de K_2SO_4 + 5 g de $CuSO_4$). Fez-se também uma amostra em

branco. Acrescentaram-se aproximadamente 5 mL de ácido sulfúrico. Uma pré-digestão foi feita por mais ou menos 12 h a frio.

Em seguida, as amostras foram aquecidas em bloco digestor até temperatura de 350°C, aumentando-se gradativamente a temperatura do bloco até que a solução estivesse verde muito claro transparente.

A amostra fria foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, lavando-se bem o tubo digestor. Foi feita a aferição. Com isso, obteve-se o Extrato 1.

1.6.2.10.3 – Curva padrão para determinação da relação da concentração de nitrogênio e absorbância

A curva foi construída com solução de cloreto de amônia 10 ppm. Foram numerados 6 balões volumétricos de 50 mL. A Tabela 1 foi seguida para construção da curva de calibração para esta análise.

Tabela 1 - Curva padrão para análise de proteína bruta

Concentração de nitrogênio (ppm)	NH ₄ Cl 10 ppm (mL)	NaOH 10% (mL)	Silicato de Sódio 20% (mL)	Reagente de Nessler (mL)
0	0	1	1	2
0,2	1	1	1	2
0,4	2	1	1	2
0,6	3	1	1	2
0,8	4	1	1	2
1,0	5	1	1	2

O volume dos balões foi completado com água destilada. A amostra foi deixada em repouso por 30 min. Em seguida, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 410 nm.

1.6.2.10.4 – Determinação da concentração de proteína bruta na amostra

Foi colocado 1 mL do Extrato 1 em um balão volumétrico de 50 mL, com um pouco de água para diluição prévia. Foram acrescentados 1 mL de hidróxido de sódio 10%, 1 mL de silicato de sódio 20%, 2 mL do reativo de Nessler e aferido com água destilada. Foi deixado em repouso por 30 min. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro.

As leituras foram feitas com comprimento de onda igual a 410 nm. Com a Equação 7, obteve-se o teor de proteína bruta da amostra.

$$\%Proteína = ABS_{Amostra} \times (\text{fator da curva padrão}) \times 6,25 \quad (7)$$

1.6.3 – Microrganismos

O microrganismo empregado foi *Aspergillus niger* CCT 0916 cedido pela EMBRAPA Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza (CE). Os conídios da linhagem foram preservados em tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo solo estéril, onde foram estocados a -18°C.

1.6.4 – Processo fermentativo

1.6.4.1 – Inóculo

Com alça de platina, os conídios foram retirados do solo estéril e transferidos para um meio básico. Este meio, composto por pectina cítrica (10 g/L), NaNO₃ (3 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO₄·7H₂O (0,01 g/L) e Agar-agar (20 g/L), foi previamente esterilizado por 20 min a 111°C e, ainda quente, inclinado (COURI, 1993). Após a transferência, o meio com os conídios foram incubados por cinco dias em estufa a 30°C.

Os tubos contendo os esporos do 1º repique foram mantidos sob refrigeração por um período máximo de quatro meses. O segundo repique foi obtido de modo semelhante ao primeiro, partindo dos esporos de primeiro repique, sendo estes utilizados para obtenção de grande quantidade de esporos no meio de sabugo de milho.

O meio de sabugo foi preparado de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, com sede no Rio de Janeiro (RJ), no qual primeiro foram preparadas as seguintes soluções:

- ✓ Solução A: foram pesados 20 g de fosfato de potássio monobásico. Foram dissolvidos em água destilada. Em seguida, a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, onde foi aferida.
- ✓ Solução B: foram pesados 3,96 g de sulfato de zinco e dissolvidos em um pouco de água destilada. Adicionaram-se 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico (95-97%). Após completa dissolução, a solução foi avolumada para 100 mL com água destilada.
- ✓ Solução umidificante: foram pesadas 2,8 g de peptona e foi dissolvida em um pouco de água destilada. A solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, onde se adicionou 0,19 mL da solução A e 0,025 mL da solução B e, em seguida, foi avolumada.

Para cada Erlenmeyer de 125 mL, foram pesados 4,6 g de sabugo de milho seco e moído e adicionados 6 mL da solução umidificante. Os frascos foram fechados com tampão de algodão envolvidos em gaze, homogeneizados e esterilizados em autoclave por 1 h a 120°C.

Para inoculação no meio de sabugo de milho, foram transferidos 10 mL de solução 0,3 % (v/v) de Tween 80 para tubos com os microrganismos de segundo repique. Com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram suspensos e foi transferido 1 mL para cada frasco com o sabugo. Os frascos foram agitados manualmente e incubados em estufa úmida a 30°C por um período de 5 dias. Após este período, os frascos foram armazenados sob refrigeração e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

Nos frascos de sabugo com esporos, foram adicionados 40 mL de solução 0,3 % (v/v) de Tween 80. Após agitação vigorosa, os esporos foram transferidos para Erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de acordo com o planejamento experimental (item 1.6.4.3).

1.6.4.2 – Condições de cultivo

O meio de cultivo foi preparado com os resíduos obtidos de acordo com o descrito no item 1.6.1 e, então, foi hidratado com água até se obter o teor de umidade definido. Nesse volume de água, foi diluído o sulfato de amônio, de forma a se obterem as concentrações previamente definidas. Tanto a umidade do meio quanto a concentração de sulfato de amônio foram definidas segundo o planejamento experimental proposto (item 1.6.4.3).

Para o processo de fermentação, foram seguidos os passos abaixo:

1) Foram pesados 10 g de meio úmido e transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL. O meio foi esterilizado a 111°C por 5 min;

2) Inoculou-se a suspensão de esporos de *Aspergillus niger* CCT 0916 na concentração de esporos segundo o planejamento experimental (item 1.6.4.3). Cobriu-se o frasco com tampão, confeccionado com gaze e algodão. Os Erlenmeyers foram levados para estufa bacteriológica úmida na temperatura segundo o planejamento experimental (item 1.6.4.3);

3) Retiraram-se amostras em intervalos regulares de tempo durante 78 h de fermentação, e dessas amostras analisou-se a umidade (item 1.6.2.4), o pH (item 1.6.2.3) e açúcares redutores (item 1.6.2.7);

4) Do meio fermentado, fez-se a extração das enzimas. Após a extração, determinou-se a atividade poligalacturonásica.

1.6.4.3 – Planejamento experimental: melhor condição da fermentação em escala bancada

Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^4 completo, onde os fatores observados foram a umidade inicial do meio (U), a quantidade de esporos inoculados (E),

a concentração de sulfato de amônio como aditivo (N) e a temperatura de incubação (T_f). A resposta observada foi a atividade poligalacturonásica (PG).

No planejamento, foi considerado para cada variável de entrada um nível inferior (-1), um superior (+1) e um ponto central (0), compondo assim a matriz de planejamento. Foram feitas 7 repetições no ponto central.

Com os resultados obtidos na execução do planejamento experimental fatorial, foi realizada a regressão dos dados para obtenção de um modelo empírico. A validação do modelo foi feita através do Teste F para verificar se este foi significativo ao nível de confiança fixado. Por fim, a superfície de resposta foi construída. Os cálculos desta seção foram realizados com o auxílio do programa Statistica.

Na Tabela 2 e 3, respectivamente, encontram-se os valores dos níveis das variáveis do planejamento experimental e sua matriz de planejamento.

Tabela 2 – Níveis das variáveis para melhor condição da fermentação em escala bancada

Variáveis	Nível (-1)	Ponto Central (0)	Nível (+1)
U (% b.u)	30	40	50
E (esporos/g)	10^6	10^7	10^8
N (% m/m)	0,5	1,0	1,5
T_f (°C)	25	30	35

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2⁴

Ensaio	U*	E*	N*	T _f *
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0

(*) variáveis codificadas

1.6.5 – Extração do complexo enzimático

A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 2,5 mL/g de meio fermentado de tampão acetato 200 mM pH 4,5. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho-maria por 1 h a 30°C e filtradas em papel filtro Wattman 1 (CASTILHO, 1997).

1.6.6 – Determinação da atividade poligalacturonásica (PG)

Para a quantificação da atividade enzimática nos extratos da fermentação, em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25%, foi adicionado 0,25 mL do complexo enzimático. Em seguida, os tubos foram levados para o banho-maria a 35°C por 30 min para reagirem. Após a reação, 0,5 mL da mistura foi transferido para tubos contendo 1 mL de reagente DNS. 0,5 mL de água destilada foi transferido nos tubos e levado ao aquecimento a 100°C por 5 min, seguido de resfriamento a temperatura ambiente. Foram adicionados 8 mL de água destilada e homogeneizado. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram realizados ensaios sem reação (também realizados em triplicata) onde foi adicionado o extrato enzimático à solução de ácido poligalacturônico e, imediatamente, transferida para os tubos de ensaios contendo DNS. A curva padrão foi feita com solução de ácido galacturônico na faixa de 0 a 2 mg/mL.

Definiu-se que uma unidade de atividade poligalacturonásica corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido galacturônico por 30 minuto da reação, a 35°C.

Para os cálculos, foi utilizada a Equação 8.

$$PG \text{ (U/g)} = \frac{(ABS_{\text{amostra}} - ABS_{\text{branco}}) \times f \times 17 \times 4 \times 2,5}{212,16 \times 30} \quad (8)$$

Em que: PG = atividade poligalacturonásica expressa em unidades de atividade por gramas de meio úmido;
 ABS = absorbância;
 f = fator de conversão da curva padrão (mg/L);
 17 = diluição da enzima no meio reacional;
 4 = diluição dos grupos redutores no reagente DNS;
 212,16 = peso molecular do ácido poligalacturônico (g/mol);
 30 = tempo de reação (min);
 2,5 = razão da adição da solução de tampão acetato 200mM pH 4,5 na extração da enzima.

1.7 – Resultados e discussão

1.7.1 – Avaliação da temperatura em um processo de fermentação semissólida para produção de poligalacturonases

Realizou-se esse ensaio preliminar com o objetivo de avaliar a temperatura de produção de poligalacturonases, percebendo o comportamento da umidade, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica com a variação da temperatura de fermentação.

Estes ensaios foram realizados com bagaço de caju adquirido na EMPASA de Campina Grande, seguindo a preparação do substrato como descrito no item 1.6.1, deste capítulo. Procedeu-se a caracterização do resíduo para conhecimento prévio de suas características físico-químicas (item 1.6.2). Em seguida, foram realizadas fermentações, fixando a umidade inicial em 50 %(b.u.), a concentração de inóculo em 10^7 esporos/g de meio úmido e 0,5 %(m/m) de sulfato de amônio, segundo trabalhos desenvolvidos anteriormente (ALCÂNTARA, 2008).

Na Tabela 4, encontram-se os parâmetros observados e os desvios padrões para a caracterização físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju.

Tabela 4 – Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju

Parâmetro	Unidade	Valor
Umidade	%b.u	18,01 ± 0,45
Resíduos minerais	%b.u	1,40 ± 0,34
pH	---	3,73 ± 0,11
SS	°Brix	30,00 ± 0,00
AR	g/100g	32,61 ± 0,68
Pectina	%pectato de cálcio	6,95 ± 0,33
D	g/mL	0,53 ± 0,001

Na Figura 2, encontra-se a distribuição granulométrica do pedúnculo de caju seco. Observa-se que 61,5% do bagaço ficaram retidos nas peneiras de 24 e 35 mesh, correspondendo aos tamanhos de 0,7 e 0,42 mm, respectivamente.

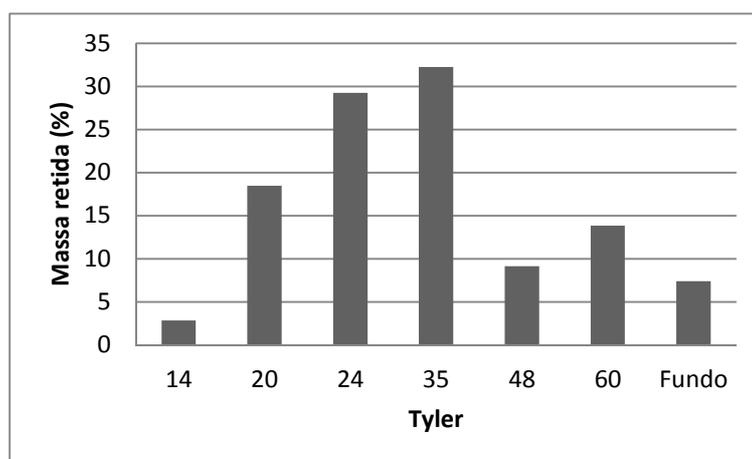


Figura 2 – Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju

Na Figura 3 encontra-se a cinética para umidade do meio nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.

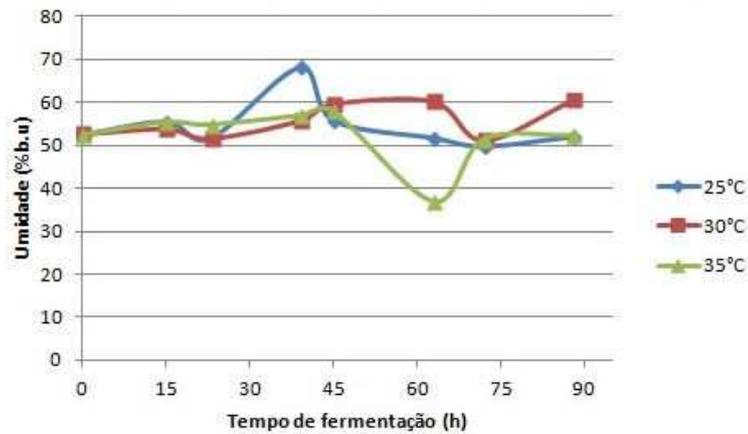


Figura 3 – Comportamento cinético no meio de cultivo

Observa-se que a umidade (Figura 3) apresentou um pico às 39 h na temperatura de 25°C. Na temperatura de 30°C, observa-se um patamar entre as 43 e 63 h de fermentação. Para a cinética de 35°C foi observado um ponto muito abaixo dos valores observados nas outras cinéticas.

O pH (Figura 4) inicial dos ensaios foi em torno de 3,4. Maiorano (1990), estudando a produção de pectinases por *Aspergillus sp.* em fermentação semissólida, usando farelo de trigo como substrato, observou que o valor de pH inicial do meio que proporciona maior produção enzimática situou-se ao redor de 3,6.

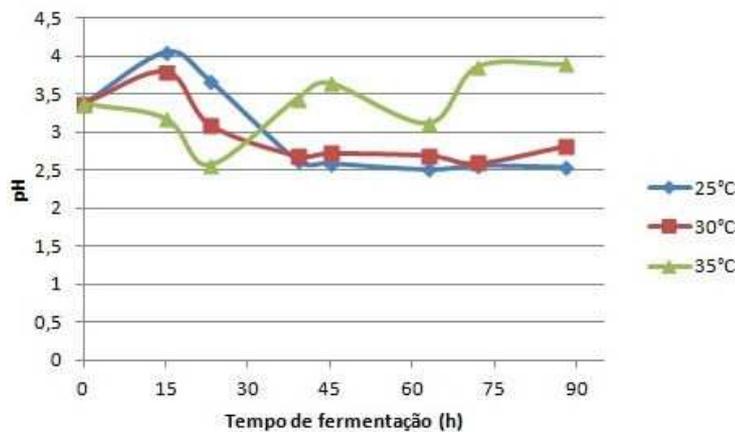


Figura 4 – Comportamento cinético do pH

Assim, observa-se que houve uma diminuição drástica no pH dos ensaios nas temperaturas de 25 e 30°C, terminando o processo fermentativo com valores próximos a 2,5. Esta diminuição iniciou-se a partir das 15 horas. Já o ensaio com 35°C não apresentou comportamento definido, possuindo máximos e mínimos, com pH entre 2,5 e 4,0, durante todo o processo fermentativo.

Na Figura 5 encontra-se o comportamento da concentração de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de fermentação para cada ensaio.

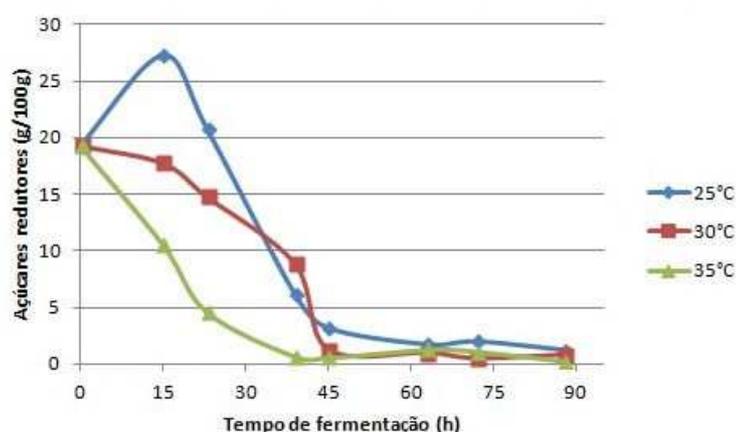


Figura 5 – Comportamento cinético da concentração de açúcares redutores

Observa-se queda acentuada na concentração de açúcares do meio, chegando a quase zero, em todas as temperaturas de fermentação, a partir das 15 horas, indicando que houve consumo deste pelos microrganismos.

Diversos trabalhos descrevem que altos rendimentos são obtidos em meios que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina, já que altas concentrações de açúcares desfavorecem o consumo de pectina, inibindo a produção de pectinases (SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Os picos de máxima produção de poligalacturonases (Figura 6) foram observados às 15 horas para a temperatura de 25°C e 23 horas para as temperaturas de 30 e 35°C.

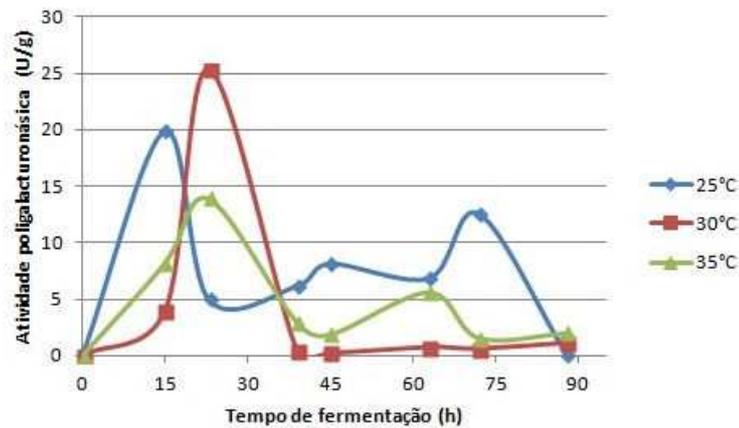


Figura 6 – Comportamento cinético da atividade poligalacturonásica

As maiores atividades observadas foram 20, 25 e 14 U/g para os processos fermentativos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, respectivamente.

Trabalhos encontrados na literatura não são unânimes quanto à temperatura de fermentação para produção de pectinases. Antier et al. (1993) utilizaram temperatura de fermentação de 25°C para produção de pectinases, usando polpa de café como substrato e *Aspergillus niger* C28B25. Berovic e Ostroversnik (1997) obtiveram melhor atividade poligalacturonásica com temperatura de fermentação igual a 35°C, usando bagaço de maçã como substrato e *Aspergillus niger* A 163 como microrganismo. Taragano e Pilosof (1999) usaram temperatura de incubação igual a 28°C, usando farelo de trigo como substrato e *Aspergillus niger* 148 como microrganismo. Fawole e Odunfa (2003) constataram que a melhor temperatura foi igual a 40°C, usando farelo de arroz como substrato e *Aspergillus niger* V. Tieghem como microrganismo.

Observando os trabalhos citados, percebe-se que a temperatura de fermentação vai depender do substrato empregado, assim como a linhagem do microrganismo empregado, mas também de outros fatores operacionais como tipo de reator, massa de meio a ser fermentada, concentração de inóculo, entre outros.

As Figuras 7, 8 e 9 mostram o aspecto do fermentado após 45 horas de processo, em suas respectivas temperaturas de fermentação.



Figura 7 – Fermentado após 45 horas de fermentação a 25°C.

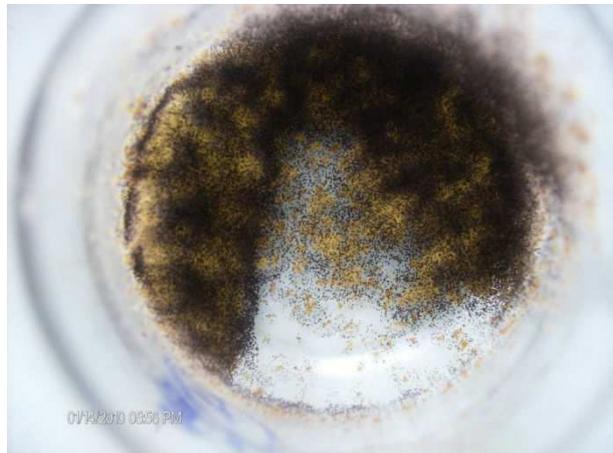


Figura 8 - Fermentado após 45 horas de fermentação a 30°C.



Figura 9 - Fermentado após 45 horas de fermentação a 35°C.

Comparando as Figuras 7, 8 e 9, observa-se uma maior quantidade de esporos no fermentado com temperatura de 35°C. Contudo, a maior produção enzimática não foi obtida neste ensaio. Além disso, o ensaio com temperatura de 25°C visualmente é o que possui menos esporos, todavia, observa-se atividade poligalacturonásica maior em relação à atividade obtida no ensaio a 35°C. Assim, fica o indicativo de que a temperatura de máxima de produção enzimática é diferente da temperatura para máximo para crescimento do microrganismo.

Hamidi-Esfahani et al. (2004), usando planejamento experimental fatorial, estudaram o efeito simultâneo da temperatura e da umidade para crescimento do *Aspergillus niger* ATCC 10864, em meio semissólido. Estes autores observaram que a melhor temperatura foi de 35°C com meio umidificado a 55%.

O objetivo deste ensaio preliminar foi alcançado já que se pode perceber que, dentro da faixa de temperatura estudada, as variáveis do processo (umidade, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica) de fermentação mostraram comportamento diferente. Assim, é de extrema importância o estudo da temperatura e sua influência junto aos demais fatores que foram estudados no planejamento experimental desde capítulo (item 1.7.2).

1.7.2 – Melhor condição do processo de fermentação semissólida para produção de poligalacturonase usando bagaço de caju

O bagaço de caju utilizado nos experimentos para fermentação em escala bancada foi cedido pela empresa de polpa de frutas FRUNAT. Seguiu-se a preparação do mesmo como descrito no item 1.6.1 deste capítulo. Realizou-se a caracterização físico-química (item 1.6.2), a análise do comportamento das variáveis umidade, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica ao longo das fermentações e, através da metodologia de superfície de resposta, aplicou-se um planejamento experimental como descrito anteriormente (item 1.6.4.3), verificando-se a influência dos fatores umidade inicial do meio, concentração de sulfato de amônio, concentração inicial de inóculo e temperatura no processo de fermentação.

Na Tabela 5 encontram-se os parâmetros observados e o desvio padrão para caracterização físico-química do bagaço de caju seco utilizado.

Tabela 5 – Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju utilizado na melhor condição da fermentação em escala bancada

Parâmetro	Unidade	Valor
Umidade	%b.u	15,23 ± 0,13
Resíduos minerais	%b.u	2,56 ± 0,04
pH	---	3,58 ± 0,19
SS	°Brix	35,00 ± 0,0
AR	g/100g	33,02 ± 1,30
ART	g/100g	29,62 ± 1,43
Pectina	%pectato de cálcio	14,26 ± 1,03
Proteína	%	7,67 ± 0,70
D	g/mL	0,65 ± 0,006

O pH e a densidade encontrados para o bagaço de caju foi próximo dos valores citados na literatura. O bagaço seco com baixa umidade foi obtido para subsequente adição de água, correspondendo a uma umidade final igual à observada no planejamento experimental (item 1.6.4.3). A quantidade de açúcar também condiz com o observado na literatura para o caju da região, diferentemente do valor observado para pectina (SANTOS et al., 2008; ALCÂNTARA et al., 2010). Os sólidos solúveis estão acima dos reportados na literatura (BRANDÃO et al., 2003; MATIAS et al., 2005).

Na Tabela 5, o valor de açúcares redutores totais (ART) foi menor que o valor dos açúcares redutores. Por definição, ART é a quantidade de açúcares redutores (glicose e frutose) mais a quantidade de redutores obtida após a inversão da sacarose (quebra da sacarose por ação ácida em glicose e frutose). Ou seja, o valor de ART tem de ser maior que o valor de AR.

Assim, procedeu-se a análise de AR e ART no HPLC (High performance liquid chromatography). Pesou-se 0,5 g da amostra que foi diluída para 100 mL de água destilada, por um tempo de 30 min. Em seguida, a amostra foi filtrada com papel de filtro quantitativo e levada para análise no HPLC. Observou-se que a quantidade de açúcares redutores (AR) foi igual a 32,97 g/100g e a de sacarose foi igual a 1,26 g/100g. Assim, a quantidade de açúcares redutores totais (ART) é igual a 34,23 g/100g.

Como a quantidade de sacarose é muito pequena, a metodologia com DNS não é suficientemente sensível à sua detecção, fazendo parte do erro metodológico.

A Figura 10 mostra a distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju. Observa-se que 63 %(m/m) do bagaço ficou retido nas peneiras de 20 e 24 mesh, que correspondem aos tamanhos 0,85 e 0,7 mm, respectivamente.

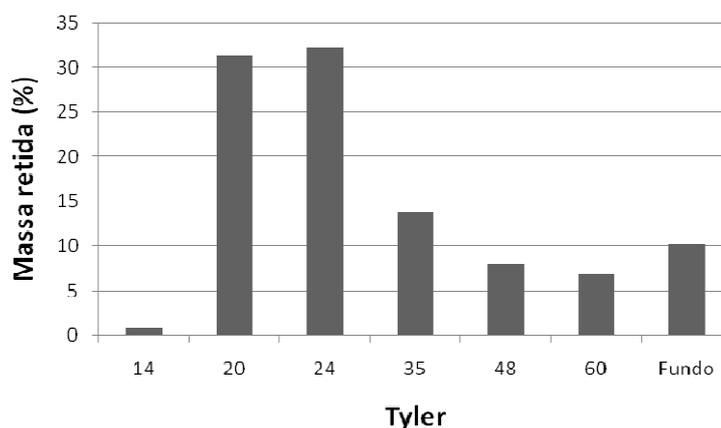


Figura 10 – Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju

Este tamanho de partícula pode ser usado em um processo de fermentação semissólida com *Aspergillus niger*, assim como foi descrito por Tari et al. (2007) e Souza et al. (2010).

1.7.2.1 – Cinética fermentativa

Foram observados o comportamento dos parâmetros umidade, pH, AR e atividade poligalacturonásica em um tempo de 78 horas de fermentação. A descrição dos ensaios realizados encontra-se no item 1.6.4.3 deste trabalho.

Os testes 1, 3, 5, 9, 11, 13 e 15, todos com 30 %(b.u), não fermentaram. Nesses ensaios, observou-se que todos os parâmetros cinéticos não mostraram variação considerável e permaneceram próximos dos seus valores iniciais. A Figura 11 mostra a cinética fermentativa para o ensaio 1, representando os outros testes mencionados.

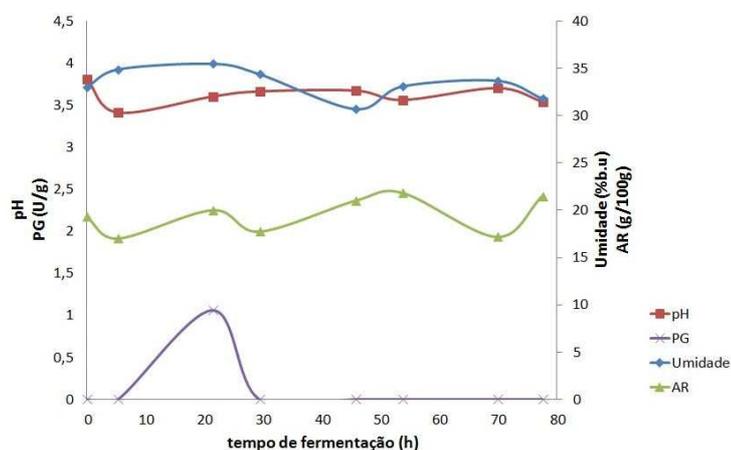


Figura 11 - Cinética fermentativa do ensaio 1 ($U = 30 \text{ \% (b.u)}$, $E = 10^6$ esporos/g, $N = 0,5 \text{ \% (m/m)}$, $T_f = 25^\circ\text{C}$)

De acordo com Castilho et al. (2000), em um meio sem água disponível para o microrganismo, o fungo sofre mudanças em suas membranas celulares, levando a limitações em seu transporte e, conseqüentemente, afetando o metabolismo microbiano.

O único teste, com umidade inicial de 30 %(b.u), com resquícios de produção enzimática foi o ensaio 7 (Figura 12). Para este ensaio, a cinética da umidade mostrou um pequeno aumento, no qual pode-se atribuir à respiração microbiana. Para o pH e os açúcares redutores (AR) observa-se uma pequena queda ao longo da cinética. O pico de atividade poligalacturonase (5 U/g) foi observado às 46 horas de fermentação.

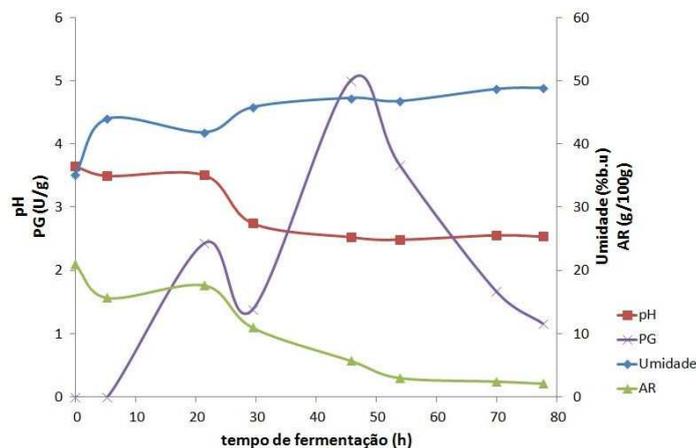


Figura 12 – Cinética fermentativa do ensaio 7 ($U = 30 \text{ \%b.u.}$), $E = 10^8$ esporos/g, $N = 1,5 \text{ \%m/m}$ e $T_f = 25^\circ\text{C}$)

Nos ensaios 2, 6, 14 e 16, a umidade permaneceu sem maiores alterações. Todos esses testes possuem 50 \%b.u. de umidade inicial. Em relação ao pH, observou-se sua queda a partir das 21 horas de fermentação, em todos os testes mencionados. A diminuição nos valores de pH pode está relacionada com a produção de ácido cítrico pelo microrganismo (BEROVIC & OSTROVERSNIK, 1997). Além disso, a enzima produzida é uma enzima ácida. Os açúcares redutores foram consumidos até valores perto de zero, variando apenas o horário de início do consumo.

Nos ensaios 2 e 6, observou-se picos de atividade poligalacturonásica às 54 horas de fermentação (15 U/g). A diferença entre esses dois testes é a concentração de sulfato de amônio (0,5 e 1,5 \%m/m , respectivamente), indicando que esta variável não tem influência sobre o processo quando a umidade inicial foi 50 \%b.u. , concentração de esporos de 10^6 esporos/g e temperatura de fermentação de 25°C .

No ensaio 14, foi obtida a maior atividade poligalacturonásica (33 U/g). Observou-se comportamento similar entre o pH e os açúcares redutores, já que em ambos observa-se queda em seus valores a partir das 21 horas de fermentação (Figura 13).

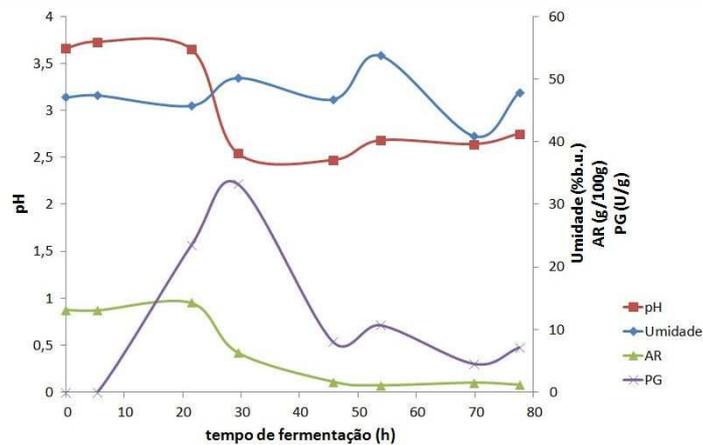


Figura 13 – Cinética fermentativa do ensaio 14 ($U = 50 \text{ \% (b.u.)}$, $E = 10^6$ esporos/g, $N = 1,5 \text{ \% (m/m)}$, $T_f = 35^\circ\text{C}$)

Comparando os ensaios 14 e 16, sabendo que a diferença entre ambos é a concentração de esporos inoculada (10^6 e 10^8 esporos/g, respectivamente), observou-se que com menor quantidade de inóculo, o microrganismo iniciou a produção a partir das 5 horas de fermentação. Entretanto, com pico de atividade poligalacturonásica às 29 horas, mostrando que o consumo de açúcares foi praticamente todo para produção enzimática. Por outro lado, no teste 16, ocorreu o consumo de açúcares redutores nas primeiras horas de fermentação, indicando que o microrganismo os utilizou para manutenção e reprodução, já que o pico de atividade poligalacturonásica foi observado apenas às 70 horas (Figura 14).

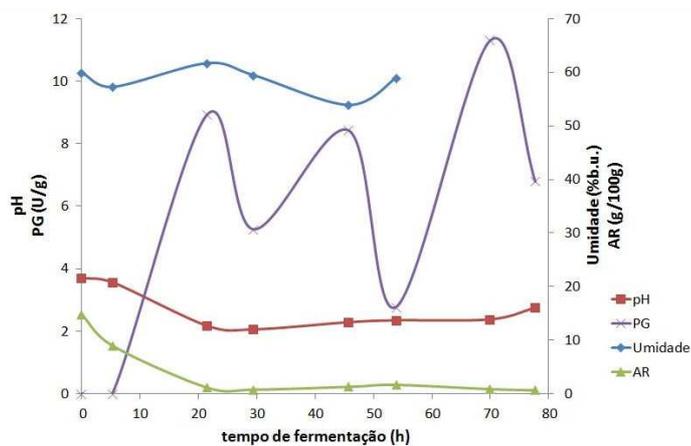


Figura 14 – Cinética fermentativa do ensaio 16 ($U = 50 \text{ \% (b.u.)}$, $E = 10^8$ esporos/g, $N = 1,5 \text{ \% (m/m)}$, $T_f = 35^\circ\text{C}$)

Nos ensaios 4, 8, 10 e 12, todos também com 50 %(b.u) de umidade inicial, observou-se uma pequena diminuição nos valores de umidade ao longo da cinética, queda nos valores de pH e açúcares redutores no início da fermentação e pico de atividade poligalacturonásica (10 U/g) ocorreu entre as 29 e 46 horas, com exceção do ensaio 10, com pico de 24 U/g, no mesmo tempo de fermentação.

Com relação aos testes 17 a 23, observam-se pequenas variações na umidade ao longo da cinética. O pH e os açúcares redutores diminuíram ao longo da cinética, observando que ocorreu produção enzimática em todos os ensaios. As atividades poligalacturonásicas para estes ensaios podem ser encontradas na Figura 15. Este comportamento mostra dificuldade na reprodução dos experimentos em um processo de fermentação semissólida. Del Bianchi et al. (2001) atribuem essa dificuldade a heterogeneidade do substrato, usualmente resíduos orgânicos.

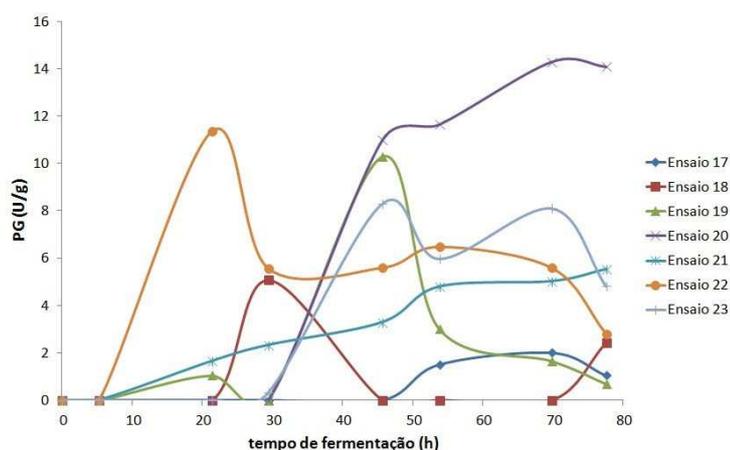


Figura 15 – Cinética fermentativa da atividade poligalacturonásica para os ensaios 17 a 23

Souza et al. (2010) observaram as variáveis cinéticas umidade, açúcares redutores, pH e atividade poligalacturonásica até 72 horas de fermentação, usando casca do maracujá como substrato e *Aspergillus niger* CCT0916 como microrganismo, com 40 %(b.u) de umidade inicial e 1 %(m/m) de sulfato de amônio. Os autores encontraram que o pH permaneceu constante ao longo da cinética. A atividade poligalacturonásica máxima (21 U/g) ocorreu às 66 horas de fermentação. Os açúcares redutores foram consumidos a partir das 22 horas e a umidade permaneceu sem mudanças significativas.

1.7.2.2 – Influência da umidade, concentração de esporos, concentração de sulfato de amônio e temperatura sobre a atividade poligalacturonásica

Através da aplicação da metodologia de superfície de resposta, aplicando um planejamento experimental 2^4 , objetivou-se a melhor condição da fermentação semissólida para produção de poligalacturonases, verificando a influência das variáveis: concentração de inóculo (E), concentração de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (N), umidade inicial do meio (U) e temperatura de fermentação (T_f), de acordo com a metodologia apresentada neste capítulo (item 1.6.4.3).

A maior atividade poligalacturonásica (33,27 U/g) encontrada durante a execução do planejamento foi obtida sob as condições iniciais de 50 % (b.u) de umidade inicial, 10^6 esporos/g, 1,5 % (m/m) de sulfato de amônio e 35°C às 29 horas de fermentação.

A partir da regressão dos dados de atividade poligalacturonásica e dos valores dos fatores estudados, construíram-se modelos de primeira ordem com 95% de confiança para todos os tempos de fermentação (Tabela 6).

A validação do modelo foi feita usando o Teste F. Este teste mostra a razão entre o valor de F calculado e F tabelado, sabendo que este último foi igual a 2,75. Quando esta razão é maior do que 1, a regressão é estatisticamente significativa. Para uma regressão não apenas estatisticamente significativa, mas também preditiva, o valor da razão entre os dois F's deve ser maior que 4 (BARROS NETO et al., 2010).

Em relação ao coeficiente de determinação (R^2), sabe-se que o maior valor possível é 1, significando que entre a curva e os pontos experimentais não existe nenhum resíduo e toda a variação em torno da média é explicada pela regressão (SANTOS et al., 2008).

Tabela 6 - Modelos empíricos para a atividade poligacaturonásica em cada tempo de fermentação

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
PG5 = 0,42 + 0,54U + 0,30E + 0,37N - 0,37T _f + 0,37UE + 0,30UN - 0,30UT _f + 0,54EN - 0,54ET _f - 0,61NT _f	0,5832	1,679	0,611
PG21 = 3,74 + 3,95U - 0,90E + 1,93N + 2,09T _f - 0,95UE + 1,64UN + 2,41UT_f - 0,0006EN - 1,79ET _f - 0,19NT _f	0,7464	3,533	1,285
PG29 = 5,52 + 6,93U - 2,80E + 0,004N + 1,64T _f - 2,97UE - 0,17UN + 1,81UT _f - 0,77EN - 2,71ET _f + 0,89NT _f	0,8000	4,800	1,746
PG46 = 5,29 + 4,59U - 0,81E - 1,63N + 0,52T _f - 1,44UE - 2,26UN + 1,15UT _f + 0,77EN - 1,53ET _f + 0,02NT _f	0,6785	2,533	0,921
PG54 = 4,78 + 4,12U - 2,81E - 0,44N - 0,06T _f - 3,06UE - 1,11UN + 0,19UT _f + 0,21EN - 0,08ET _f - 0,49NT _f	0,8398	6,289	2,290
PG70 = 4,41 + 3,79U - 0,79E + 0,01N + 0,29T _f - 1,05UE - 0,14UN + 0,55UT _f + 0,42EN + 0,14ET _f - 0,38NT _f	0,4909	1,157	0,421
PG78 = 3,64 + 3,12U - 1,34E - 0,08N + 0,58T _f - 1,48UE - 0,22UN + 0,73UT _f + 0,13EN + 0,01ET _f - 0,28NT _f	0,5696	1,588	0,578

Assim, das equações listadas na Tabela 6, os modelos para as 21, 29 e 54 horas de fermentação foram considerados estatisticamente significativos. Assim como os coeficientes em negrito nas equações, para 95% de confiança.

Para as equações estatisticamente significativas, as maiores atividades poligalacturonásicas, assim como as condições de fermentação e a produtividade correspondente, encontram-se descritas na Tabela 7. Observa-se que para as 21 e 29 horas a produtividade foi praticamente a mesma, assim como as condições de fermentação.

Tabela 7 - Maiores atividades poligalacturonásicas obtidas para 21, 29 e 54 horas:
condições de cultivo e produtividade

t (h)	PG _{máx} (U/g)	U (%(b.u))	E (esporos/g)	N (%(m/m))	T _f (°C)	Prod (U/g.h)
21	23,49	50	10 ⁶	1,5	35	1,12
29	33,27	50	10 ⁶	1,5	35	1,15
54	18,05	50	10 ⁶	0,5	35	0,33

Para confirmar e detalhar os cálculos estatísticos feitos para os modelos empíricos, nas Tabelas 8, 9 e 10 apresenta-se a ANOVA para verificação estatística de tais modelos nos tempos de fermentação de 21, 29 e 54 horas, respectivamente.

Tabela 8 - Análise de variância para a equação correspondente a 21 horas de fermentação

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	594,680	10	59,468	1,285
Resíduo	202,009	12	16,834	
Total	796,689	22		
R ²	0,7464			
F _{tab} 95%				2,75

Tabela 9 - Análise de variância para a equação correspondente a 29 horas de fermentação

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	1269,282	10	126,928	1,746
Resíduo	317,292	12	26,441	
Total	1586,574	22		
R ²	0,8000			
F _{tab} 95%				2,75

Tabela 10 - Análise de variância para a equação correspondente a 54 horas de fermentação

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	575,524	10	57,552	2,290
Resíduo	109,812	12	9,151	
Total	685,336	22		
R ²	0,8398			
F _{tab} 95%				2,75

As Figuras 16, 17 e 18 indicam o perfil da curva que representa o efeito sinérgico dos fatores estudados sobre a resposta, para cada tempo de fermentação. Estas figuras mostram a influência da umidade inicial (U), da concentração de esporos inoculada no meio (E), da concentração de sulfato de amônio (N) e da temperatura de fermentação (T_f) sobre a resposta atividade poligalacturonásica (PG) para os tempos de fermentação de 21, 29 e 54 horas.

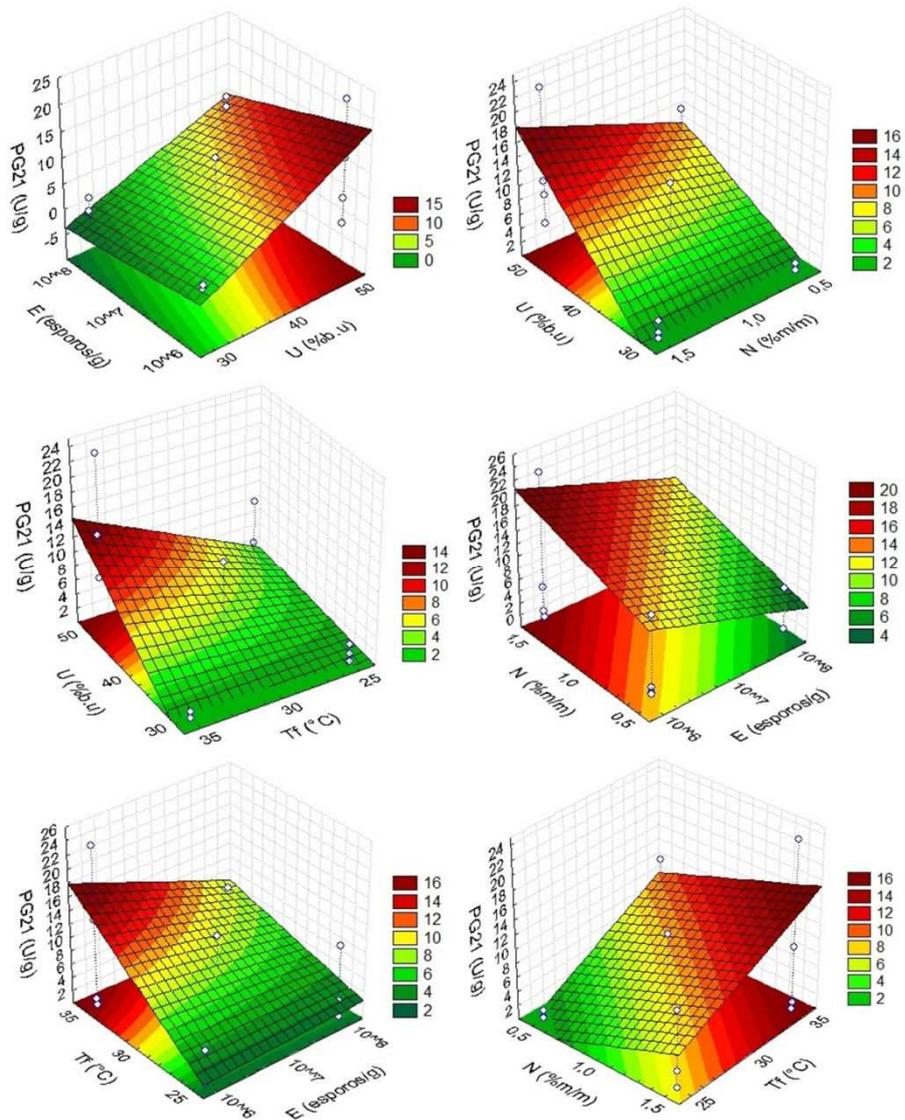


Figura 16 – Superfícies de resposta para a atividade poligalacturonásica às 21 horas de fermentação

Para as superfícies representadas pela Figura 16, o maior pico de atividade poligalacturonásica calculado pelo modelo (20 U/g) foi obtido nos níveis superior para a umidade inicial, inferior para a concentração de inóculo, superior para a concentração de sulfato de amônio e superior para a temperatura de fermentação.

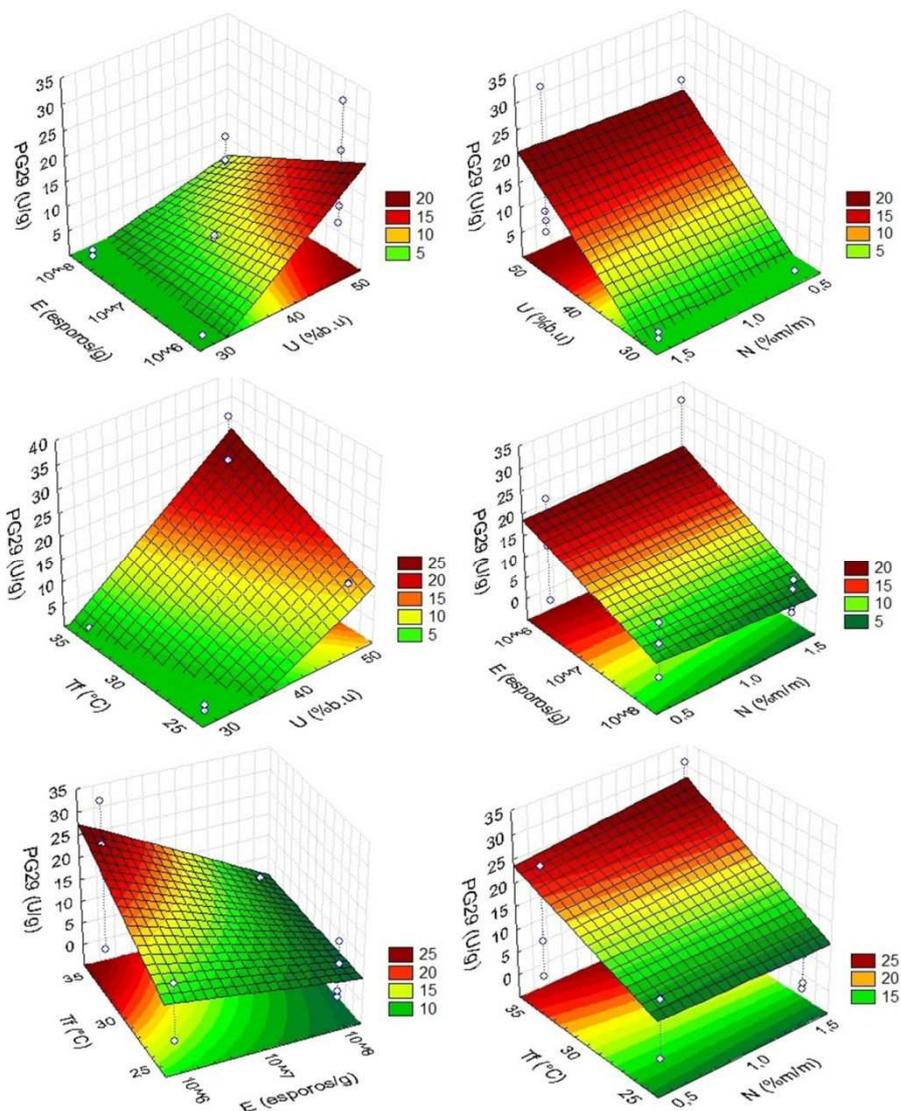


Figura 17 – Superfícies de resposta para a atividade poligalacturonásica às 29 horas de fermentação

Para as superfícies representadas pela Figura 17, o maior pico de atividade poligalacturonásica calculado pelo modelo (25 U/g), foi obtido nos níveis superior para a umidade inicial, inferior para a concentração de inóculo e superior para a temperatura de fermentação. A concentração de sulfato de amônio não teve influência significativa no processo com tempo de fermentação de 29 horas.

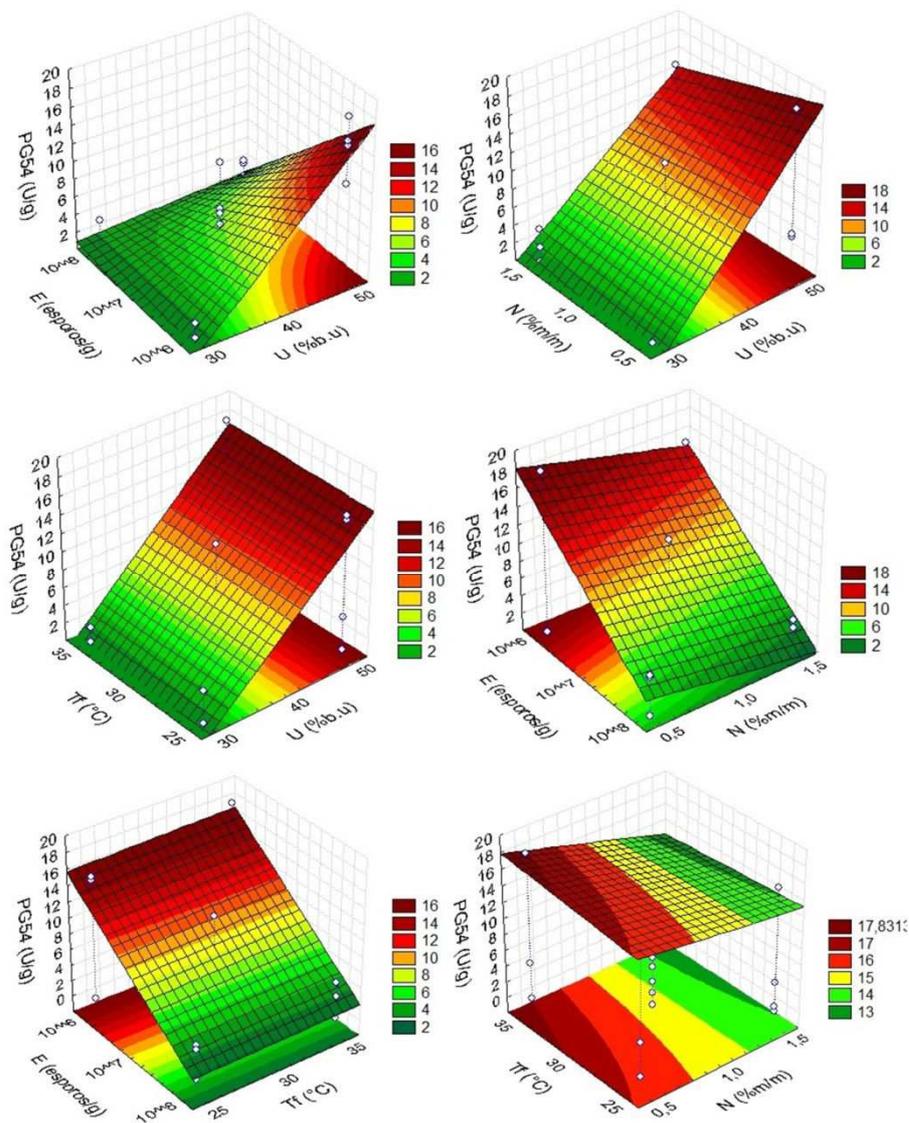


Figura 18 – Superfícies de resposta para a atividade poligalacturonásica às 54 horas de fermentação

Para as superfícies representadas pela Figura 18, o maior pico de atividade poligalacturonásica calculado pelo modelo (18 U/g), foi obtido nos níveis superior para a umidade inicial, inferior para a concentração de inóculo, inferior para a concentração de sulfato de amônio e superior para a temperatura de fermentação.

Segundo o gráfico de Pareto, (Figura 19), a variável que mais influenciou o processo de fermentação com tempo de 21 horas foi a umidade inicial do meio.

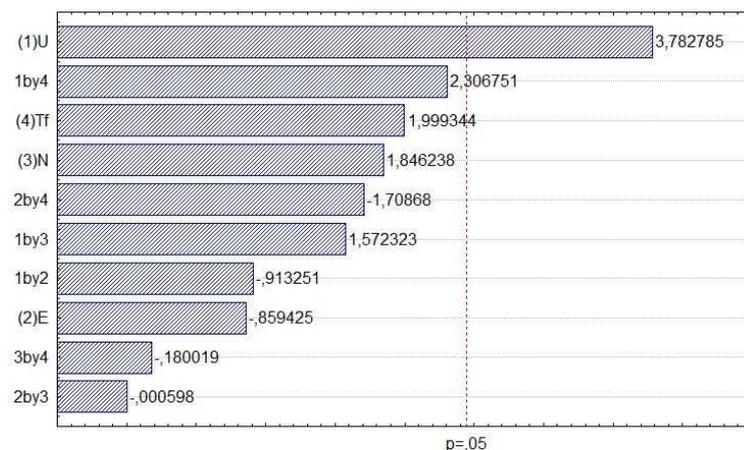


Figura 19 - Gráfico de Pareto para 21 horas de fermentação

Para as 29 horas de fermentação (Figura 20), todas as variáveis estudadas influenciaram de forma significativa o processo fermentativo, com exceção da concentração de sulfato de amônio.

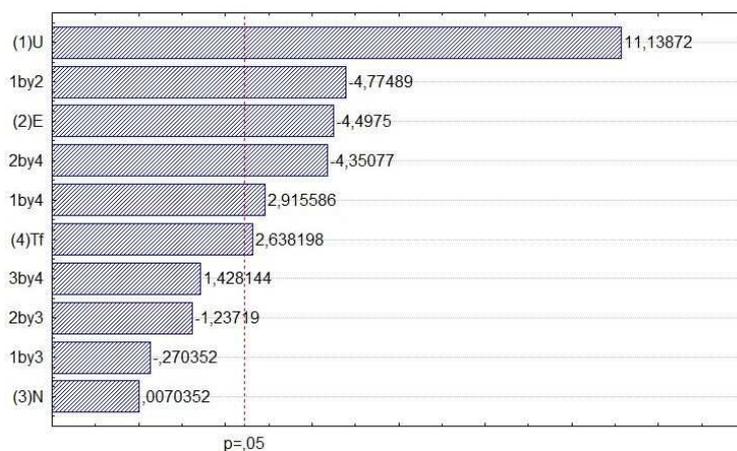


Figura 20 - Gráfico de Pareto para 29 horas de fermentação

Para as 54 horas de fermentação (Figura 21), as variáveis estudadas que influenciam de forma significativa o processo fermentativo foram a umidade inicial do meio e a concentração de esporos inoculada.

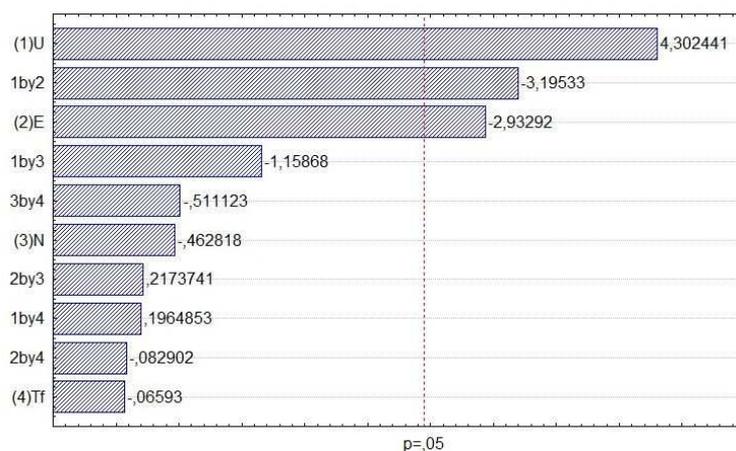


Figura 21 - Gráfico de Pareto para 54 horas de fermentação

De modo geral, para todo o processo fermentativo, observou-se que a umidade inicial tem a maior influência sobre a atividade poligalacturonásica, o que confirma declarações reportadas na literatura sobre a quantidade de água ser, portanto, um fator limitante (DEL BIANCHI et al., 2001; PINTO et al., 2006). A concentração de sulfato de amônio não teve influência relevante sobre a resposta.

Berovic e Ostrovernisk (1997) estudaram o efeito da temperatura em um processo de fermentação semissólida, usando *Aspergillus niger* A 163 e bagaço de maçã como substrato, em um biorreator tipo tambor rotativo, com 15 L de meio sólido. A temperatura foi estudada entre a faixa de 22 a 60°C, observando sua influência sobre a atividade poligalacturonásica. A concentração de esporos inoculado foi igual a 5×10^8 esporos/mL. A temperatura de 35°C foi encontrada como a mais suscetível à produção de enzimas poligalacturonases.

Similarmente ao que foi descrito neste trabalho, Bari et al. (2010) estudaram a influência da concentração de sulfato de amônio (0,25-0,45%), pH (4,82-6,12) e tempo de fermentação (50-90 h) sobre a produção da enzima endopectinase em um processo de fermentação semissólida, usando bagaço de maçã, como substrato, e *Aspergillus niger* PC5. Observou-se que a concentração de sulfato de amônio tem efeito positivo sobre a atividade enzimática, contudo, o efeito foi insignificante comparado ao tempo de fermentação.

A produção de poligalacturonase usando o bagaço seco do pedúnculo de caju como substrato é competitiva em relação a outros resíduos reportados na literatura, como por exemplo, a casca do maracujá (21 U/g) (SOUZA et al., 2010), bagaço seco do caju lavado (10,4 U/g) (SANTOS et al., 2008) e bagaço de maçã (10,88 U/mL) (BARI et al., 2010).

Capítulo 2

Ampliação de escala do processo fermentativo

Poligalacturonases são enzimas que têm aplicações tecnológicas, funcionais e biológicas no processamento de alimentos e nas interações fungo-plantas. Em sua produção, o biorreator funciona como o coração do processo de fermentação, onde a matéria-prima, em condições favoráveis, é convertida. Maximizar a taxa de formação desse produto é a chave para otimizar o processo de produção. O objetivo desse capítulo é analisar a influência da espessura da camada de meio sólido e da temperatura de fermentação, através do processo de fermentação semissólida, usando um biorreator tipo bandeja. Para isso, foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com delineamento composto central rotacional (DCCR), aplicando a metodologia de superfície de resposta, verificando a influência das variáveis citadas sobre a resposta atividade poligalacturonásica. Comparou-se a fermentação nessa escala com a fermentação em escala de bancada.

2.1 – Biorreatores utilizados na FSS

Ao contrário dos sistemas para FS_m, os biorreatores para FSS ainda são pontos de pesquisas principalmente devido a problemas associados com a pouca mistura do leito sólido e a transferência de calor (RAGHAVARAO et al., 2003).

Existem quatro tipos de reatores usados em processos de FSS (COUTO & SANROMÁN, 2006):

- **Bandeja.** O substrato é espalhado sobre as bandejas formando uma fina camada com apenas alguns centímetros de profundidade. O reator é mantido em uma estufa a temperatura constante com ar úmido circulando (Figura 22). A principal desvantagem desse sistema é a necessidade de uma numerosa quantidade de bandejas para sua utilização em larga escala.

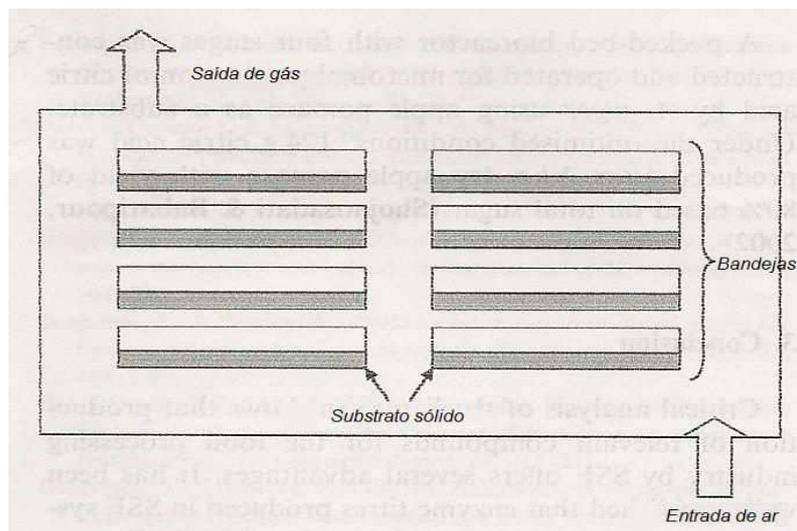


Figura 22 - Esquema de um biorreator bandeja (COUTO & SANROMÁN, 2006)

- **Leito empacotado.** Normalmente consiste de uma coluna de vidro ou plástico, onde ar úmido é forçado através do substrato. Pode ser construído com uma camisa para circulação de água para controle da temperatura durante a fermentação (Figura 23). Essa configuração é normalmente empregada na produção de fabricação de koji. Os principais inconvenientes desse sistema são as dificuldades na obtenção de produtos, a não uniformidade no crescimento do microrganismo, pouco calor removido e problemas na ampliação de escala.

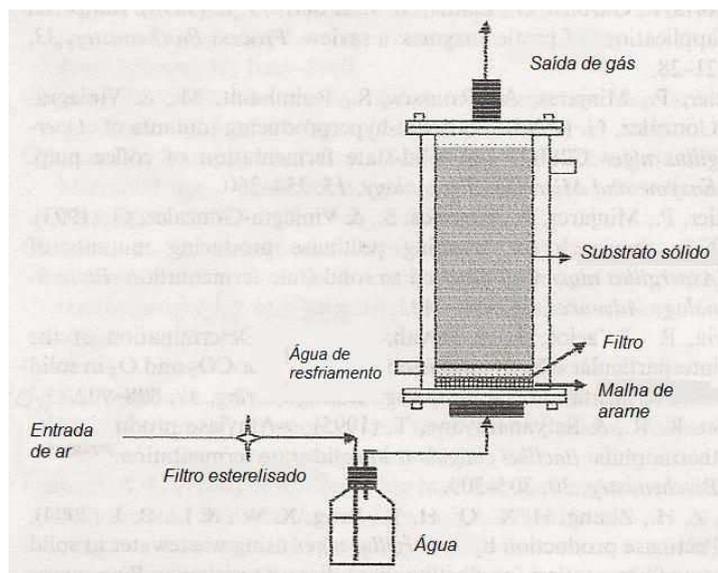


Figura 23 - Esquema de um biorreator de leito empacotado com entrada de ar úmido (COUTO & SANROMÁN, 2006)

- Tambor horizontal. Esta configuração permite aeração e mistura do substrato. A mistura é feita pela rotação do reator ou por vários agitadores com pás (Figura 24). A maior desvantagem é que o tambor deve fermentar apenas com 30% de sua capacidade, de outro modo a mistura do substrato é ineficiente.

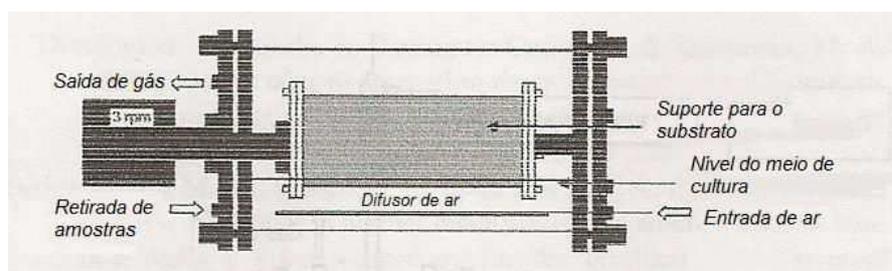


Figura 24 - Esquema de um biorreator do tipo tambor horizontal com entrada de ar úmido e agitação mecânica (COUTO & SANROMÁN, 2006)

- Leito fluidizado. No sentido de evitar adesão e aglomeração das partículas de substrato, este tipo de reator emprega a contínua agitação com ar forçado (Figura 25). Entretanto a mistura do substrato pode provocar danos ao inóculo, assim como o acúmulo de calor pode afetar o rendimento e as propriedades do produto final.

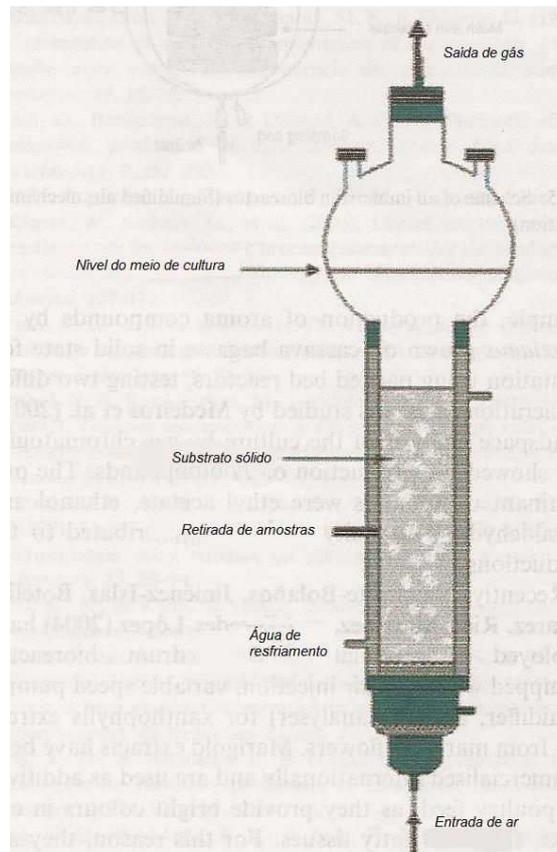


Figura 25 - Esquema de um biorreator de leito fluidizado com entrada de ar úmido e agitação pneumática (COUTO & SANROMÁN, 2006)

As diversas desvantagens dos tipos de reatores mencionados acima promovem a necessidade do desenvolvimento de novos tipos de reatores ou modificação e ajustes operacionais dos já existentes. Estas configurações devem ser capazes de operarem continuamente com alta produtividade por um período prolongado de tempo e sem problemas operacionais, assim como permitir sua ampliação de escala (COUTO & SANROMÁN (2006).

2.2 – Reator bandeja

Os parâmetros mais importantes a serem considerados durante a ampliação de escala de um biorreator para FSS são a agitação, aeração e transferência de oxigênio, temperatura e umidade do substrato (RAGHAVARAO et al., 2003). Contudo, deve-se levar

em consideração também o tipo de microrganismo utilizado e o bioproduto a ser produzido (COUTO et al., 2003).

Como visto anteriormente, existem vários tipos de reatores utilizados no processo de fermentação semissólida. Segundo Mitchell et al. (2003), um reator bandeja consiste em uma câmara, na qual o ar com temperatura e umidade relativa controlada, circula em torno de uma série de bandejas. Cada bandeja contém uma fina camada de profundidade. Vale salientar que a mistura intermitente do meio pode ser realizada, mas geralmente isto ocorre apenas uma vez por dia. Além disso, os autores não observaram avanços significativos nesse tipo de reator durante décadas.

A ampliação usando um reator bandeja não pode ser feita simplesmente aumentando a espessura do meio na bandeja, pois isso acarreta problemas de superaquecimento. Para esse tipo de reator, a ampliação de escala deve ser feita através do aumento da área da bandeja, o que pode ser feita usando-se bandejas mais amplas (MITCHELL et al., 2000).

Segundo Pandey (2004), os reatores do tipo bandeja são limitados pela transferência de massa e de calor, podendo desenvolver grandes temperaturas internas e gradientes de concentração de gás com altura do substrato acima de 40 mm.

Sendo assim, parece unânime entre os autores que a temperatura é uma das variáveis mais importantes para esse tipo de reator. Segundo Dalsenter et al. (2005), é quase impossível manter a temperatura do leito no valor ideal de produção, portanto, o processo fermentativo irá sofrer variações de temperatura que podem ser de até 10°C acima do valor ideal.

2.3 – Materiais e métodos

Todas as análises descritas neste trabalho foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica LEB/UAEQ, da Universidade Federal de Campina Grande – PB.

2.3.1 – Bagaço seco do pedúnculo de caju

O caju foi adquirido na Empresa de Abastecimento de Serviços Agrícolas (EMPASA) de Campina Grande - PB. As etapas de recepção, secagem, trituração e armazenamento foram procedidas de acordo com a metodologia descrita pelo item 1.6.1 (Capítulo1), deste trabalho.

2.3.2 – Análises físico-químicas para caracterização do bagaço seco do pedúnculo de caju

As análises de caracterização do bagaço foram feitas de acordo com metodologia descrita neste trabalho (item 1.6.2 – Capítulo 1).

2.3.3 – Processo fermentativo

O microrganismo empregado foi *Aspergillus niger* CCT0916 cedido pela EMBRAPA Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza (CE).

O inóculo foi cultivado segundo Couri (1993) (item 1.6.4.1 - Capítulo 1). A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada.

As condições de fermentação foram definidas a partir dos resultados apresentados no Capítulo 1 (item 1.7.2.2), tendo em vista a maior atividade poligalacturonásica obtida. Assim, a fermentação realizou-se sob as seguintes condições: 50 %(b.u) de umidade inicial do meio, 10^6 esporos/g de concentração de inóculo e 1,5 %(m/m) de sulfato de amônio.

O meio de cultivo foi preparado com os resíduos obtidos de acordo com o descrito no item 1.6.1 e, então, foi hidratado com água até se obter o teor de umidade de 50 %(b.u). Nesse volume de água, foi diluído 1,5 %(m/m) de sulfato de amônio.

Para o processo de fermentação, foram seguidos os passos abaixo:

1) Pesaram-se 500 g de meio úmido e foram transferidas para bandeja de polipropileno com dimensões definidas, de forma a se obter a espessura da camada

definida pelo planejamento experimental (item 2.3.3.1). O meio foi esterilizado a 111°C por 5 min (Figura 26);

2) Inoculou-se a suspensão de esporos de *Aspergillus niger* CCT0916. As bandejas foram levadas para estufa bacteriológica úmida na temperatura segundo o planejamento experimental (item 2.3.3.1);

3) Retiraram-se amostras em intervalos regulares de tempo durante 77 h de fermentação, e dessas amostras analisou-se a umidade (item 1.6.2.4), o pH (item 1.6.2.3) e açúcares redutores (item 1.6.2.7);

4) Pesaram-se 2,5 g do meio fermentado para extração das enzimas. Após a extração, determinou-se a atividade poligalacturonásica.



Figura 26 - Biorreator tipo bandeja com meio de cultivo

2.3.3.1 – Planejamento experimental: otimização do processo de produção de poligalacturonases usando reator bandeja

Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^2 com delineamento composto central rotacional (DCCR), onde os fatores observados foram a espessura da camada de substrato (C) e a temperatura do processo (T_b). A resposta observada foi a atividade poligalacturonásica (PG).

No planejamento, foi considerado para cada variável de entrada um nível inferior (-1), um superior (+1), um ponto central (0), um nível inferior rotacional ($-\alpha$) e um nível superior rotacional ($+\alpha$), compondo assim a matriz de planejamento. Foram feitas 3 repetições no ponto central.

Com os resultados obtidos na execução do planejamento experimental fatorial, foi realizada regressão dos dados para obtenção de um modelo empírico. A validação do modelo foi feita através do Teste F para verificar se este será significativo ao nível de confiança fixado. Por fim, a superfície de resposta foi construída. Os cálculos desta seção foram realizados com o auxílio do programa Statistica.

Na Tabela 11 encontram-se os valores dos níveis das variáveis do planejamento experimental.

Tabela 11 – Níveis das variáveis para ampliação de escala em reator bandeja

Variáveis	Nível (-1,41)	Nível (-1)	Ponto Central (0)	Nível (+1)	Nível (+1,41)
C (mm)	12	20	40	60	68
T _b (°C)	23	25	30	35	37

Na Tabela 12 encontra-se a matriz de planejamento.

Tabela 12 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2² + DCCR

Ensaio	C*	T _b *
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

(*) variáveis codificadas

2.3.4 – Extração enzimática e determinação da atividade poligalacturonásica

A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 5 mL/g de meio fermentado de tampão acetato 200 mM pH 4,5. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho-maria por 1 h a 30°C e filtradas em papel filtro Wattman 1 (CASTILHO, 1997).

A quantificação da atividade enzimática nos extratos da fermentação foi realizada conforme metodologia descrita no item 1.6.6 (Capítulo 1) deste trabalho.

2.4 – Resultados e discussão

2.4.1 – Ensaio preliminar: comportamento de algumas propriedades em um processo de fermentação semissólida

Neste ensaio preliminar, realizado previamente apenas em escala laboratorial, objetivou-se verificar a ocorrência da fermentação em escala ampliada. Assim, fez-se necessário testar uma condição central para a espessura da camada de substrato, utilizando esse dado posteriormente na aplicação do planejamento experimental para avaliação da fermentação semissólida com reator bandeja.

As condições da fermentação utilizadas neste ensaio foram as mesmas condições em que se obteve a maior atividade poligalacturonásica nos ensaios realizados no Capítulo 1 (item 1.7.2.2). Ou seja, 50 % (b.u) de umidade inicial do meio, 10^6 esporos/g de concentração de esporos inoculados, 1,5 % (m/m) de concentração de sulfato de amônio e 35°C de temperatura de fermentação.

Pandey (2004) verificou que, com altura de substrato acima de 40 mm, a transferência de massa e calor, em reatores tipo bandeja, era limitada, dificultando a produção enzimática. Portanto, optou-se pela espessura da camada de substrato igual a 40 mm para este ensaio. Verificou-se também o comportamento das variáveis umidade, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica ao longo da fermentação.

Na Tabela 13 encontram-se os parâmetros observados e o desvio padrão para caracterização físico-química do bagaço de caju seco utilizado.

Tabela 13 – Análise físico-química do bagaço seco do pedúnculo de caju utilizado na avaliação da fermentação em biorreator bandeja

Parâmetro	Unidade	Valor
Umidade	%b.u	14,73 ± 0,70
Resíduos minerais	%b.u	2,07 ± 0,05
pH	---	4,15 ± 0,04
SS	°Brix	36,67 ± 2,89
AR	g/100g	31,12 ± 0,53
ART	g/100g	29,02 ± 1,51
Pectina	%pectato de cálcio	10,67 ± 0,05
Proteína	%	5,92 ± 0,32
D	g/mL	0,63 ± 0,02

Na Tabela 13, o valor de açúcares redutores totais (ART) foi menor que o valor dos açúcares redutores. Assim, procedeu-se a análise de AR e ART no HPLC (High performance liquid chromatography). Observou-se que a quantidade de açúcares redutores (AR) foi igual a 32,96 g/100g e a de sacarose foi igual a 0,08 g/100g. Assim, a quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi igual a 33,04 g/100g.

A Figura 27 mostra a distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju. Observa-se que 64 %(m/m) do bagaço ficou retido na peneira de 20, que correspondem ao tamanho 0,85 mm.

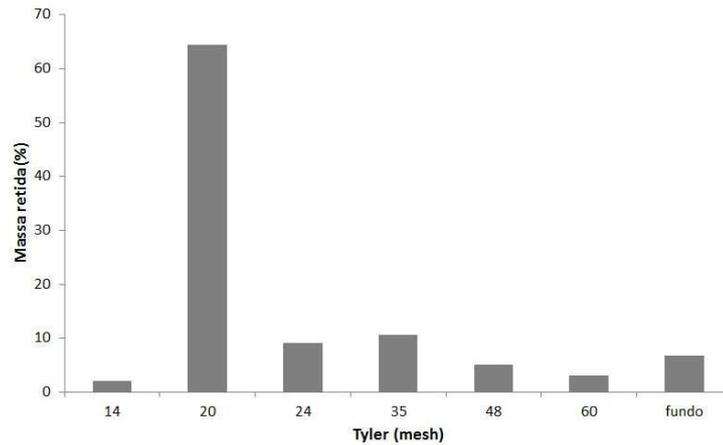


Figura 27 – Distribuição granulométrica do bagaço seco do pedúnculo de caju

A Figura 28 mostra o comportamento da umidade, ao longo do processo fermentativo, para o ensaio preliminar.

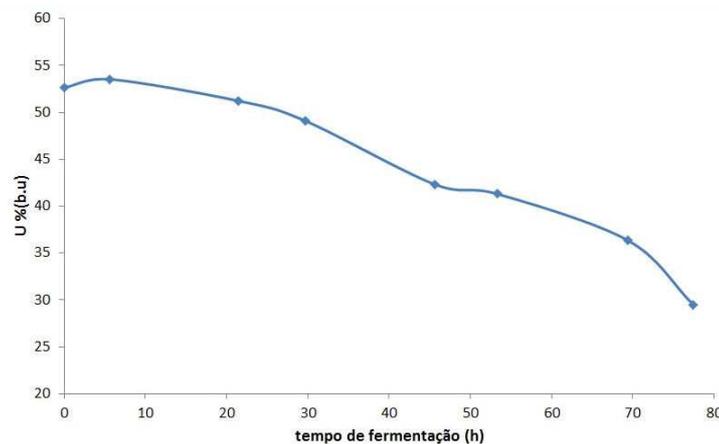


Figura 28 - Comportamento da umidade ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio

Observa-se uma diminuição nos valores de umidade, ficando em cerca de 30% ao final da cinética. Essa diminuição da umidade pode ocorrer devido ao gradiente de temperatura gerado pelo metabolismo celular, ou seja, uma temperatura maior no interior da bandeja pode ter promovido evaporação da água disponível, diminuindo assim a umidade do meio.

A Figura 29 mostra o comportamento do pH, ao longo do processo fermentativo, para o ensaio preliminar.

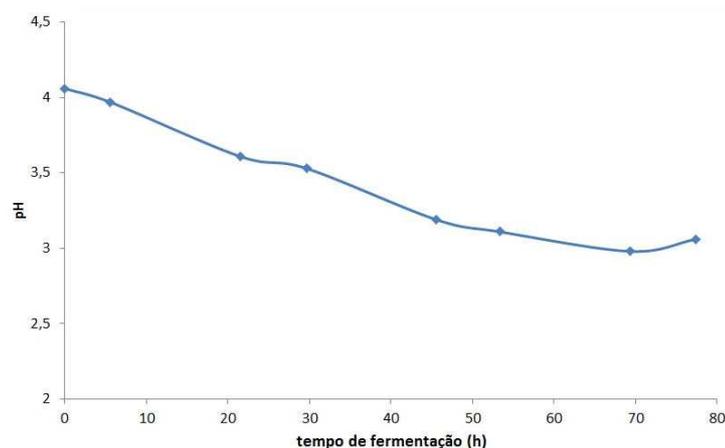


Figura 29 - Comportamento do pH ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio

O pH diminui, o que é característico das fermentações realizadas pelo microrganismo utilizado. Este comportamento indica que há produção de substâncias ácidas no processo, incluindo a poligalacturonase, que possui características ácidas. O valor inicial do pH foi em torno de 4,0 e o final foi em torno de 3,0.

A Figura 30 mostra o comportamento do AR, ao longo do processo fermentativo, para o ensaio preliminar.

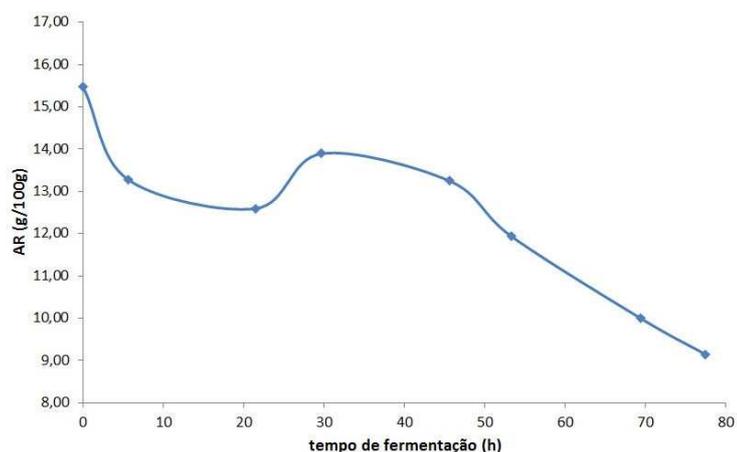


Figura 30 - Comportamento da concentração de açúcares redutores (AR) ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio

A concentração de açúcares redutores inicia-se com valores em torno de 15 g/100g. Ao final da cinética, estes valores foram para 9 g/100g, havendo a indicação do consumo de carboidratos pelo microrganismo. Este comportamento também é observado para fermentação em escala bancada. Contudo, observa-se que, nas fermentações em pequena escala, o consumo de AR é mais intenso, restando ao final da cinética, concentrações muito baixas.

A Figura 31 mostra o comportamento da atividade poligalacturonásica, ao longo do processo fermentativo, para o ensaio preliminar.

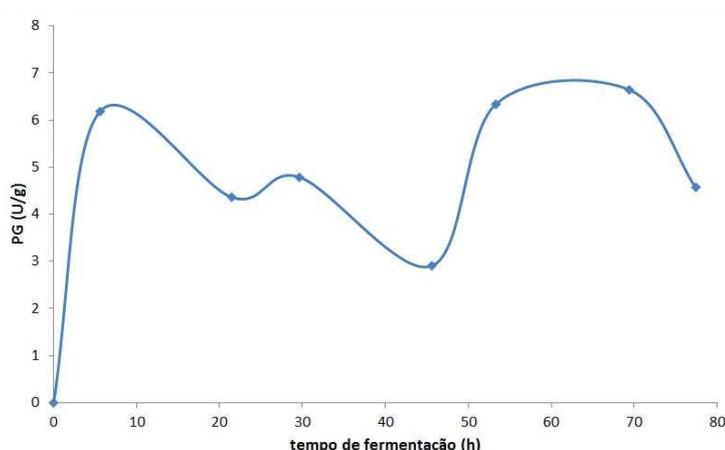


Figura 31 - Comportamento da atividade poligalacturonásica (PG) ao longo de um processo fermentativo usando reator bandeja com 40 mm de altura de meio

A maior atividade poligalacturonásica observada durante a cinética foi 6,65 U/g às 69 horas de fermentação. Contudo, a maior produtividade (1,1 U/gh) foi observada nas primeiras horas de fermentação (6 h), com atividade poligalacturonásica igual a 6,18 U/g.

Observando as Figuras 30 e 31, percebe-se que entre 20 e 50 horas de fermentação, a concentração de açúcares redutores aumentou e, entre o mesmo intervalo, a atividade poligalacturonásica caiu. Isto mostra que o microrganismo utilizou enzimas para produção de açúcares. Nos tempos subsequentes, a concentração de açúcares redutores diminuiu e a atividade poligalacturonásica aumentou, voltando a consumir os açúcares para produção de enzimas. Percebe-se o quão é importante à influência da concentração de açúcares no processo fermentativo, indicando que há um patamar inicial desejado pelo microrganismo para a produção, e que, como já percebido

em outras exposições desse trabalho, os açúcares são consumidos como aditivos no processo de fermentação.

Um registro fotográfico foi feito para a cinética do ensaio preliminar. O comportamento visual da cinética pode ser observado na Figura 32. Observa-se que ao longo da fermentação, o fungo se desenvolveu formando grumos. Diferentemente da fermentação em Erlenmeyers, onde se observa apenas uma camada fina e única, ao final da fermentação.

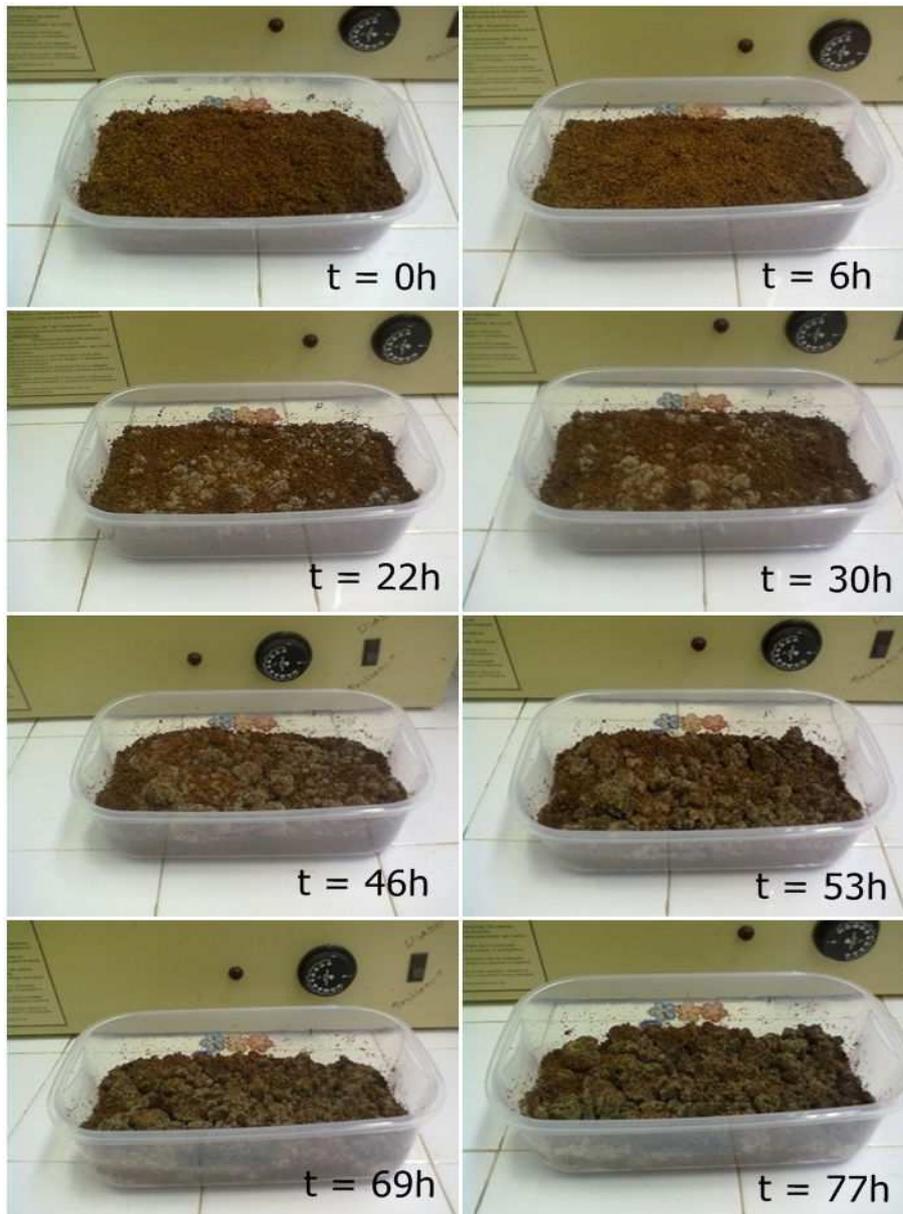


Figura 32 – Aspecto da fermentação em reator bandeja

Conclui-se que, nas condições utilizadas para verificar a ocorrência da fermentação, o processo ocorre de forma a produzir a enzima poligalacturonase. Assim, as condições relatadas neste tópico serão utilizadas como ponto de partida para o planejamento experimental descrito no item (2.3.3.1), deste trabalho.

2.4.2 – Variação da massa de fermentado em processo de fermentação semissólida

O objetivo destes ensaios foi ilustrar o comportamento do pH, umidade, açúcares redutores do meio fermentado, assim como a atividade poliglacturonásica ao longo do processo, variando a massa de meio úmido de cultivo, frente a ampliação de escala. Para isso, foram realizados 3 ensaios sob as seguintes condições: 50 %(b.u) de umidade inicial; 10^6 esporos/g de concentração de inóculo; 1,5 %(m/m) de concentração de sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio e 35°C de temperatura de fermentação. A massa de meio úmido para os ensaios foram (1) 10 g, (2) 250 g e (3) 500 g. Para os ensaios 2 e 3, a espessura média da camada de meio foi igual a 60 mm.

Os bagaços secos do pedúnculo de caju utilizados nestes experimentos possuíam características físico-químicas como descritas na Tabela 14, abaixo.

Tabela 14 – Caracterização físico-química dos bagaços utilizados na verificação da influência da quantidade de meio

Ensaio	AR (g/100g)	Pectina (%pectato de cálcio)	Proteína (%)	Cinzas (%)
1	33,02	14,26	7,67	2,56
2	34,08	8,51	5,80	1,73
3	31,12	10,67	5,92	2,07

Quanto à granulometria, no ensaio 1, 63% das partículas ficaram retidas nas peneiras de 20 e 24 mesh. No ensaio 2, 75% das partículas ficaram retidas na peneira de 24 mesh e, para o ensaio 3, 75% das partículas ficaram retidas entre as peneiras de 20 e 24 mesh. Assim, o tamanho das partículas, de modo geral, ficou entre 0,85 e 0,71 mm (20 e 24 mesh, respectivamente).

A Figura 33 mostra o comportamento da umidade, ao longo do processo fermentativo, para os 3 ensaios.

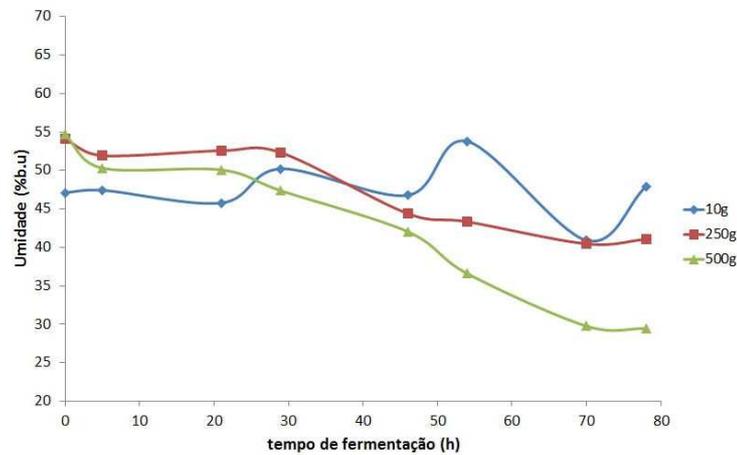


Figura 33 - Comportamento da umidade ao longo de um processo fermentativo com variação de massa

Observou-se queda nos valores de umidade para as fermentações em reator bandeja (ensaios com 250 e 500 g de meio úmido), mesmo a estufa tendo umidade relativa em torno de 65%. Pandey (2004) observou a existência de um gradiente de temperatura no meio durante a fermentação. Isto implica que possivelmente essa diminuição de umidade pode ocorrer pelo aumento da temperatura interna no meio, aumentando a taxa de evaporação de água. A fermentação em escala bancada (10 g de meio úmido) mostra pequenas variações ao longo da cinética.

A Figura 34 mostra o comportamento do pH, ao longo do processo fermentativo, para os 3 ensaios.

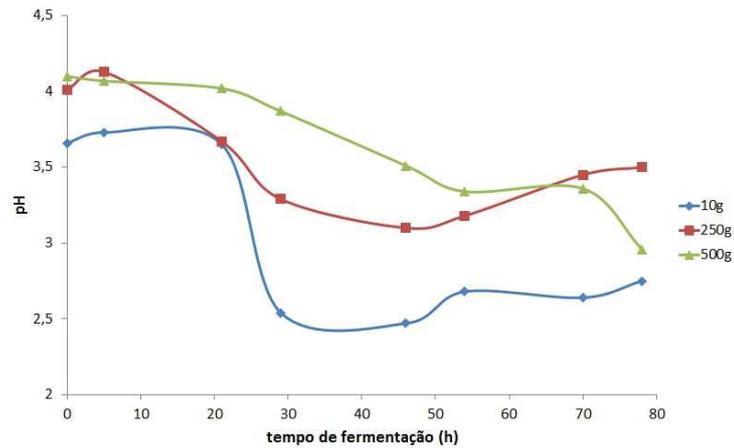


Figura 34 - Comportamento do pH ao longo de um processo fermentativo com variação de massa

Observa-se que em todos os ensaios, independentemente da massa de meio, ocorre diminuição dos valores. Isto ocorre devido à produção de substâncias ácidas, como o ácido cítrico, pelo microrganismo (BEROVIC & OSTROVERSNIK, 1997). A diminuição nos valores de pH inicia-se por volta das 21 horas, nos ensaios com 10 e 500 g de meio úmido, e 5 horas para o ensaio com 250 g.

A Figura 35 mostra o comportamento da concentração de açúcares redutores, ao longo do processo fermentativo, para os 3 ensaios.

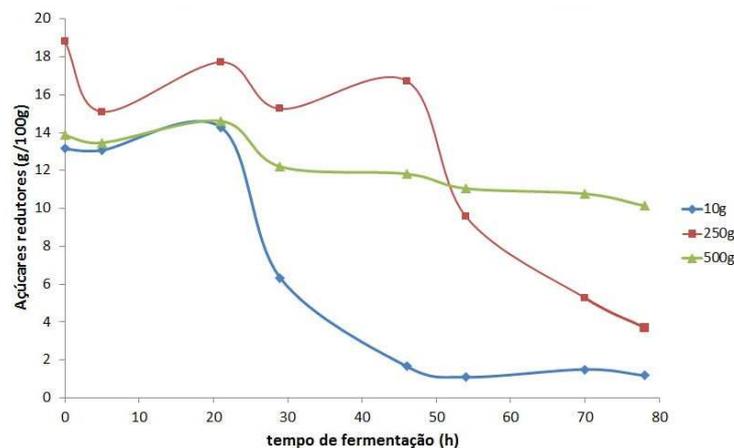


Figura 35 - Comportamento da concentração de açúcares redutores ao longo de um processo fermentativo com variação de massa

Independentemente da quantidade de massa do meio de cultivo, a concentração de açúcares redutores diminuiu, mostrando que há consumo dessas substâncias pelo

microrganismo. Para 10 e 500 g, o consumo de açúcares inicia-se a partir das 21 horas de fermentação. Para o ensaio com 250 g, o consumo de açúcares inicia-se a partir das 46 horas. Observa-se que nem todo açúcar é consumido no ensaio com 500 g. Apenas, aproximadamente 4 g/100g, foi consumido ao longo da cinética. Diferentemente dos demais ensaios cujos valores reduziram-se drasticamente.

A Figura 36 mostra o comportamento da atividade poligalacturonásica, ao longo do processo fermentativo, para os 3 ensaios.

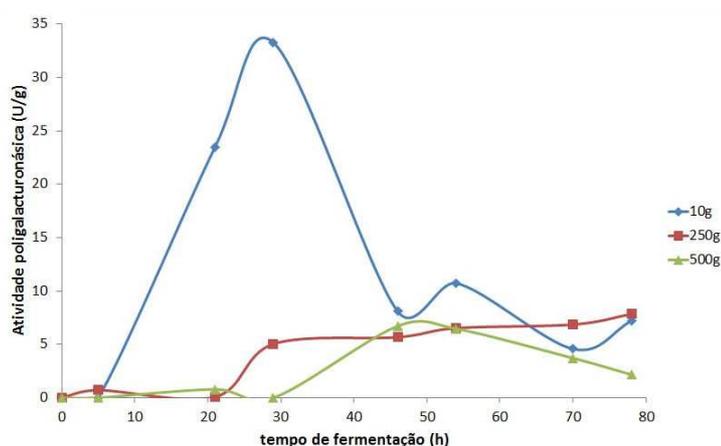


Figura 36 - Comportamento da atividade poligalacturonásica ao longo de um processo fermentativo com variação de massa

A maior atividade poligalacturonásica observada (33 U/g) nos 3 ensaios foi obtida com massa de meio de cultivo igual a 10 g. Os demais ensaios tiveram atividade máxima em torno de 7 U/g. Os tempos de fermentação em que as atividades máximas obtidas, respectivamente, para 10 g, 250 g e 500 g, foram 29, 70 e 46 horas. Este fato indica que, com maior massa de meio de cultivo, o microrganismo necessita de um tempo maior de manutenção e crescimento (adaptação), retardando o início da produção enzimática.

Segundo Santos et al. (2004), quando o assunto é a fermentação semissólida, um grande número de trabalhos foi desenvolvido em escala laboratorial, em que é relativamente fácil o controle de certos parâmetros de produção enzimática. Nesta escala, muitas produções por processo fermentativo semissólido mostram-se promissoras. No entanto, extrapolando este processo para biorreatores em escala-piloto, que contém maior quantidade de substrato, as dificuldades em realizar a fermentação

são reveladas. Assim, caracterizamos uma das dificuldades na ampliação de escala dos processos de fermentação semissólida.

2.4.3 – Otimização do processo de produção de poligalacturonases usando reator bandeja

Nesta seção objetivou-se a produção de poligalacturonases através da fermentação semissólida usando um biorreator do tipo bandeja. Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta, aplicando um planejamento experimental 2^2 com delineamento composto central rotacional (DCCR), observando a influência da temperatura de fermentação (T_b) e da espessura de substrato (C) sobre a atividade poligalacturonásica, estabelecendo a massa de meio úmido em 500 g.

O bagaço do pedúnculo de caju utilizado foi o mesmo caracterizado na seção 2.4.1. De forma resumida tem-se: 14,7 %(b.u) de umidade; açúcares redutores 31,12 g/100g; pH 4,15; sólidos solúveis 36,67°Brix e pectina 10,67 %pectato de cálcio. Com relação ao tamanho das partículas, 64% do bagaço ficou retido na peneira de 20 mesh, o que corresponde a 0,85 mm.

As fermentações foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita previamente no item 2.3.3 deste trabalho.

Com a realização dos experimentos, observou-se que a maior atividade poligalacturonásica 15,76 U/g foi obtida com 40 mm de espessura da camada de meio e 23°C de temperatura de fermentação às 69 horas. Este valor foi 40% maior do que o valor da atividade poligalacturonásica obtida no ensaio preliminar (item 2.4.1). A diferença entre estes dois ensaios está na temperatura de fermentação. No ensaio preliminar a fermentação ocorreu a 35°C.

Comparando também o desenvolvimento da fermentação em reator bandeja (massa de meio igual a 500 g) com a fermentação em Erlemmeyers (massa de meio igual a 10 g, Capítulo 1), observa-se que as atividades máximas foram obtidas em temperaturas diferentes. Além disso, a atividade poligalacturonásica obtida usando o reator bandeja foi duas vezes menor do que usando escala bancada.

A partir da regressão dos dados de atividade poligalacturonásica e os valores dos fatores estudados, construiu-se modelos de primeira ordem com 95% de confiança para

todos os tempos de fermentação (Tabela 15). Lembrando que a validação do modelo foi feita através do Teste F.

Tabela 15 - Modelos empíricos para a atividade poligacturonásica em cada tempo de fermentação usando biorreator bandeja

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
$PG5 = 0,06 + 0,21T_b - 0,17T_b^2 - 0,05C + \mathbf{0,81C^2} - 0,42CT_b$	0,7342	2,761	0,547
$PG21 = \mathbf{2,37} + 0,04T_b - \mathbf{1,07T_b^2} - 0,32C - 0,62C^2 - 0,51CT_b$	0,7913	3,793	0,751
$PG29 = \mathbf{6,21} + 1,41T_b - 1,73T_b^2 - 0,14C - \mathbf{2,96C^2} - 0,88CT_b$	0,7474	2,959	0,586
$PG45 = \mathbf{7,71} + \mathbf{1,39T_b} - \mathbf{1,62T_b^2} + \mathbf{1,23C} - \mathbf{1,67C^2} - 0,58CT_b$	0,8865	7,809	1,546
$PG53 = \mathbf{5,30} + 0,65T_b + 1,12T_b^2 + 0,26C - 0,75C^2 - 0,54CT_b$	0,5228	1,096	0,217
$PG69 = \mathbf{3,13} - \mathbf{1,94T_b} + \mathbf{3,87T_b^2} - 0,53C + 0,83C^2 - 1,37CT_b$	0,8684	6,600	1,306
$PG77 = 2,36 - 0,25T_b + 3,07T_b^2 + 0,12C + 2,60C^2 - 1,23CT_b$	0,3920	0,645	0,128

Das equações listadas na Tabela 14, os modelos para as 45 e 69 horas de fermentação foram considerados estatisticamente significativos. Assim como os coeficientes em negrito nas equações, para 95% de confiança.

Para as equações estatisticamente significativas, as maiores atividades poligacturonásicas, assim como as condições de fermentação e a produtividade correspondente, encontram-se descritas na Tabela 16.

Tabela 16 - Maiores atividades poligacturonásicas obtidas para 45 e 69 horas: condições de cultivo e produtividade

t (h)	PG _{máx} (U/g)	U (%(b.u))	E (esporos/g)	N (%(m/m))	T _f (°C)	Prod (U/g.h)
45	8,78	50	10 ⁶	1,5	30	0,20
69	15,76	50	10 ⁶	1,5	23	0,23

A Tabela 17 apresenta a ANOVA para verificação estatística dos modelos no tempo de fermentação de 45 horas.

Tabela 17 - Análise de variância para a equação correspondente a 45 horas de fermentação em biorreator bandeja

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	52,475	5	10,495	1,546
Resíduo	6,72	5	1,344	
Total	59,196	10		
R ²	0,8865			
F _{tab} 95%				5,05

A Tabela 18 apresenta a ANOVA para verificação estatística dos modelos no tempo de fermentação de 69 horas.

Tabela 18 - Análise de variância para a equação correspondente a 69 horas de fermentação em biorreator bandeja

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	124,8	5	24,97	1,306
Resíduo	18,92	5	3,785	
Total	143,8	10		
R ²	0,8684			
F _{tab} 95%				5,05

A Figura 37 indica o perfil da curva que representa o efeito sinérgico dos fatores espessura da camada de meio (C) e temperatura de fermentação (T_b) sobre a resposta atividade poligalacturonásica às 45 horas de fermentação.

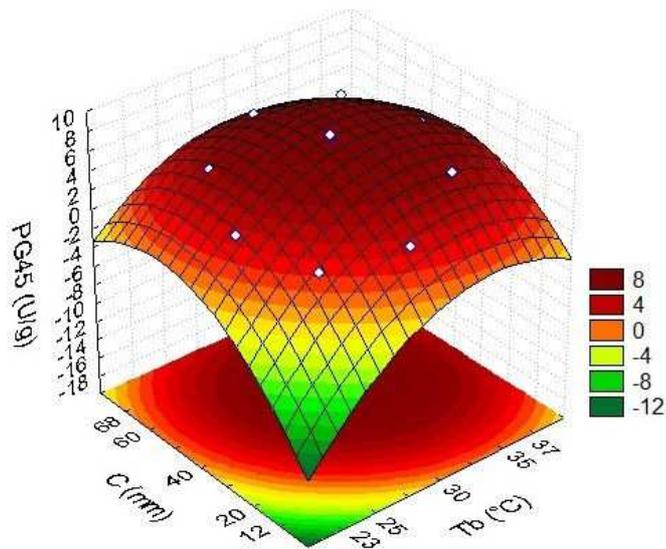


Figure 37 – Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 45 horas de fermentação usando biorreator bandeja

A superfície representada pela Figura 37 mostra a otimização do processo de produção de poligalacturonases para às 45 horas de fermentação. O ponto máximo na superfície corresponde aos valores dos fatores nos pontos centrais: 40 mm de espessura da camada de substrato e 30°C de temperatura de fermentação. O maior valor experimental obtido sob essas condições foi igual a 8,78 U/g de atividade poligalacturonásica. O maior valor de atividade enzimática obtido pelo modelo foi igual a 8 U/g.

A Figura 38 indica o perfil da curva que representa o efeito sinérgico dos fatores espessura da camada de meio (C) e temperatura de fermentação (T_b) sobre a resposta atividade poligalacturonásica às 69 horas de fermentação.

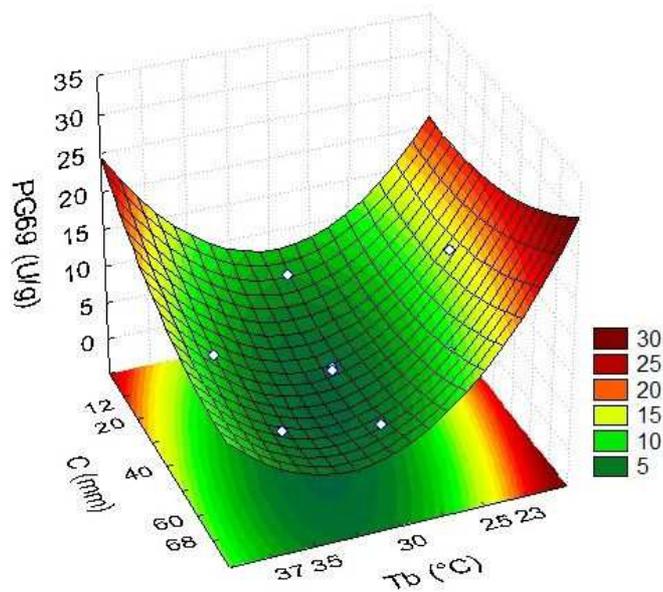


Figure 38 – Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica às 69 horas de fermentação usando biorreator bandeja

Na superfície representada pela Figura 38, o maior ponto de atividade enzimática calculada pelo modelo (30 U/g) foi encontrado com 68 mm de espessura da camada de substrato e 23°C de temperatura de fermentação. Observa-se que quanto maior a espessura da camada, menor deve ser a temperatura de fermentação. O que indica que em espessuras de camada maiores, apenas o resfriamento do reator deve ser feito, pois o calor gerado durante a fermentação é suficiente para a produção de enzimas.

Segundo o gráfico de Pareto, (Figura 39), todos os fatores influenciaram de forma significativa o processo de fermentação às 45 horas, com exceção da interação entre a espessura da camada de substrato e a temperatura de fermentação (CT_b).

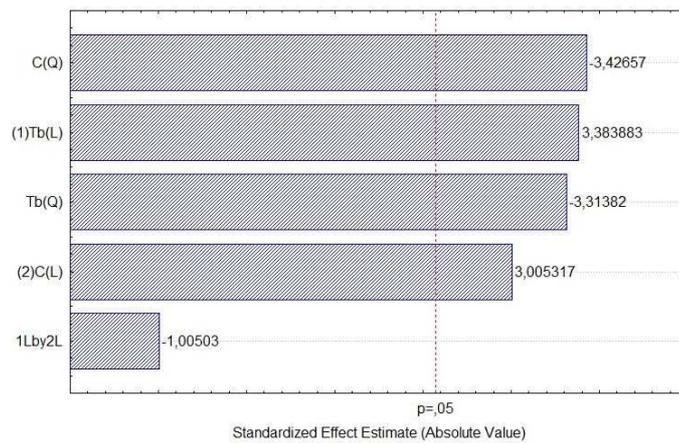


Figura 39 - Gráfico de Pareto para 45 horas de fermentação em biorreator bandeja

Segundo o gráfico de Pareto, (Figura 40), a temperatura de fermentação (T_b) foi o fator que mais influenciou o processo de fermentação às 69 horas.

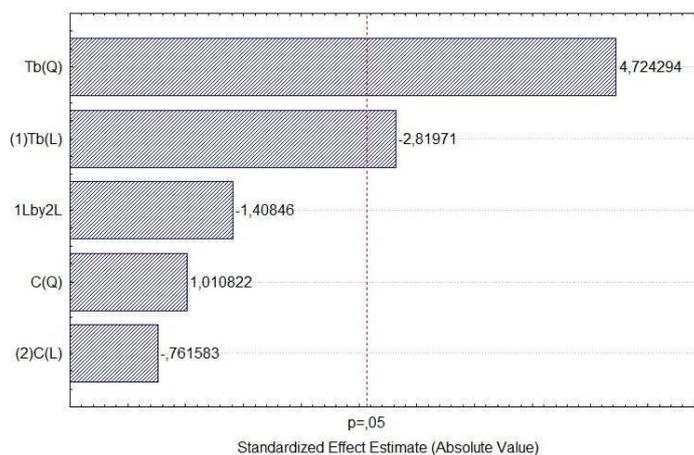


Figura 40 - Gráfico de Pareto para 69 horas de fermentação em biorreator bandeja

Segundo Pinto et al. (2006), a temperatura também é considerada um fator crítico devido ao acúmulo de calor metabólico gerado durante a fermentação, afetando diretamente a germinação dos microrganismos e a formação do produto.

Quando o assunto é a fermentação semissólida, um grande número de trabalhos foi desenvolvido em escala laboratorial, que é tarefa relativamente fácil de controlar certos parâmetros de produção de enzimas. Nesta escala, muitas produções de enzimas através da fermentação semissólida mostram-se muito promissoras. No entanto, extrapolando estes processos para biorreatores em escala-piloto, que contém maior

quantidade de substrato, as dificuldades em realizar a fermentação são reveladas. Assim, em biorreatores, a camada de substrato frequentemente atinge temperaturas acima do processo ideal, devido às dificuldades para remover o calor. Portanto, há uma possibilidade de que esse aumento de temperatura desnature as enzimas durante a fermentação (SANTOS et al., 2004).

Capítulo 3

Estabilidade enzimática

As pectinases são amplamente utilizadas na indústria de sucos de frutas, onde, entre suas aplicações estão à redução da viscosidade e a clarificação. Objetivou-se estudar a estabilidade da enzima poligalacturonase com relação à temperatura e ao pH, visando a posterior aplicação do complexo enzimático na redução da viscosidade e aumento da limpidez de sucos de frutas tropicais. A enzima foi obtida a partir da fermentação semissólida do bagaço seco do pedúnculo de caju (*Anarcadium occidentale* L.), utilizando o *Aspergillus niger* CCT0916 como agente fermentador, sob as condições de maior produtividade obtida com a fermentação em reator bandeja: umidade de 50 % (b.u), concentração de esporos de 10^6 esporos/g, concentração de sulfato de amônio igual a 1,5 % (m/m), temperatura de fermentação de 23°C e espessura da camada de meio igual a 40 mm, com tempo de fermentação de 69 horas, seguindo trabalhos descritos no Capítulo 2. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se o extrato enzimático em temperaturas de 10°C a 90°C. Para avaliação do pH, a extração enzimática foi feita na temperatura ótima de estabilidade, variando-se a solução-tampão, tendo assim pH entre 2,5 e 9,5.

3.1 – As enzimas e os efeitos da temperatura e pH

As enzimas apresentam três características importantes: são proteínas, são catalisadores e exibem seletividade sobre substratos. Elas são a forma mais comum e ubíqua de catalise biológica sendo responsáveis por processos vitais e mediando funções de síntese, rotatividade, sinalização e metabolismo. Estas podem discriminar entre substratos competidores com base em afinidades diferenciais de ligação e facilidade de catálise. Uma enzima pode ser específica se reagir apenas com substratos que tenham certo tipo de ligação química ou grupo, ou pode exibir especificidade (quase) absoluta quando uma única reação química é catalisada para um substrato definido. Além disso, as enzimas também podem exibir especificidade por produto e estereoquímica (PARKIN, 2010).

De forma resumida, a proteína ativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de Van Der Waals (GOMES et al., 2007). Com isso, variações de temperatura e pH tornam-se importantes na análise da atividade enzimática.

A temperatura tem efeito de ativação e desativação sob a atividade enzimática. Aumentos contínuos de temperatura além do máximo ou ótimo para a atividade enzimática levam a desnaturação protéica, que envolve o desdobramento de grandes segmentos da cadeia polipeptídica (GOMES et al., 2007). Em outro extremo, a inativação das enzimas por resfriamento pode ocorrer quando forças apolares estão envolvidas e na associação de polipeptídeos. A baixa temperatura reduz a força de tais interações, podendo promover a dissociação de subunidades e comprometer a atividade enzimática (PARKIN, 2010).

Com relação ao pH, todos os grupos ionizáveis das proteínas sofrerão transições dependentes do pH com base em valores intrínsecos de pKa dos resíduos de aminoácidos. Muitas dessas transições causarão impactos sobre a estabilidade da enzima e, em um determinado intervalo de pH, podem atuar em cooperação para desestabilizá-la completamente (PARKIN, 2010).

Conhecer a estabilidade ao pH e a temperatura é importante para seleção de enzimas compatíveis com as condições prevalentes para aplicação potencial de modo que a enzima persista por tempo suficiente para cumprir a função esperada.

3.2 – Estado da arte

Zheng e Shetty (2000) investigaram a viabilidade de vários tipos de resíduos de frutas processadas (maçã, oxicoco e morango), como substrato para produção de poligalacturonases, tendo como microrganismo *Lentinus edodes*, utilizando a fermentação em estado sólido. Estes autores também verificaram o efeito da temperatura e do pH sobre o extrato enzimático. A poligalacturonase produzida tem boa estabilidade térmica até 50°C e alta tolerância em pH entre 3,0 e 6,5.

Pedrolli (2008) estudou a purificação e caracterização das enzimas poligalacturonases produzidas por fermentação submersa em meio comercial, utilizando *Aspergillus giganteus*. A poligalacturonase purificada teve maiores valores em pH entre 6,0 e 7,0. E maiores valores de atividade nas temperaturas de 55 e 60°C.

Segundo Parkin (2010), de modo geral, as poligalacturonases possuem atividade enzimática máxima em intervalos de pH entre 3,5 e 6,0 e temperatura entre 40 e 55°C.

Maller et al. (2011) estudaram a produção de poligalacturonases, utilizando fermentação submersa, com casca de laranja e maracujá como substrato e o *Aspergillus niveus*, como microrganismo. Em termos de estabilidade, a poligalacturonase produzida mostrou melhor atividade na temperatura de 40°C e pH entre 3,0 e 4,5.

3.3 – Materiais e métodos

Todas as análises descritas neste trabalho foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica LEB/UAEQ, da Universidade Federal de Campina Grande – PB.

3.3.1 – Fermentação, extração e atividade poligalacturonásica

As condições de fermentação foram definidas a partir dos resultados apresentados no Capítulo 2 (item 2.4.3), tendo em vista a maior atividade poligalacturonásica obtida. Assim, a fermentação realizou-se sob as seguintes condições: 50 % (b.u) de umidade inicial do meio, 10^6 esporos/g de concentração de inóculo e 1,5% m/m de sulfato de amônio, 40 mm de espessura da camada de meio, 23°C de temperatura e 69 horas de fermentação, com massa de meio igual a 500 g.

O extrato enzimático foi obtido adicionando-se 2,5 mL/g de meio fermentado de tampão acetato 200mM pH 4,5. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho-maria por 1h a 30°C e filtradas em papel filtro Wattman 1 (CASTILHO, 1997).

Para a quantificação da atividade enzimática nos extratos da fermentação foi realizada seguindo metodologia descrita no item 1.6.6 (Capítulo 1) deste trabalho.

3.3.2 – Termoestabilidade enzimática

Amostras de extrato enzimático foram levadas ao banho-maria para estabilizar nas temperaturas correspondentes ao estudo. Verificou-se o comportamento da atividade poligalacturonásica nas temperaturas de 10 a 90°C, por 20 min. As análises foram feitas em triplicata (ZHENG e SHETTY, 2000).

3.3.3 – Estabilidade com relação ao pH

O extrato bruto foi diluído nos tampões listados a abaixo, verificando assim a influência do pH sobre a atividade poligalacturonásica. Após alcançar pH correspondente, as amostras foram incubadas por 24h a temperatura de 2°C (ZHENG e SHETTY, 2000).

- ✓ 0,1 M Glicina - HCl pH 2,5;
- ✓ Tampão acetato 200 mM pH 3,5 – 6,5;
- ✓ 0,1 M Tris - HCl pH 7,5 - 8,5;
- ✓ 0,1 M Glicina – NaOH pH 9,5.

Os resultados de termoestabilidade e estabilidade quanto ao pH foram expressos em atividade relativa (%).

3.3.4 – Tempo de estabilidade

Amostras de extrato enzimático foram levadas ao banho-maria a temperatura ótima de estabilidade e em pH ótima para verificação do seu tempo de permanência. As análises foram feitas entre os tempos de 0 a 120 min, com retirada de amostras a cada 15 min. As análises de atividade poligalacturonásica foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em atividade relativa (%).

3.4 – Resultados e discussão

A Figura 41 mostra o comportamento da atividade relativa em função da faixa de temperatura estudada.

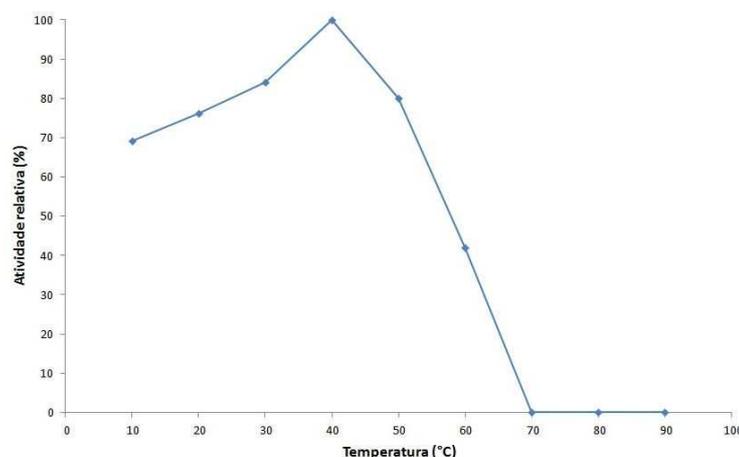


Figura 41 - Termoestabilidade da enzima poligalacturonase

Pode-se observar que entre as temperaturas de 30 e 50°C, a atividade poligalacturonásica permanece com 80% da sua atividade máxima, sendo sua temperatura ótima em 40°C. Após 50°C, a atividade relativa cai abruptamente, chegando à zero a partir de 70°C.

A maior utilização das enzimas pécnicas está na indústria de processamento de sucos de frutas, onde este processo ocorre normalmente entre 30 e 50°C. Assim, a enzima produzida permanecerá ativa durante o processo. Para inativação da mesma, o binômio tempo e temperatura devem ser considerados, assim como as características do suco. Usualmente, a inativação enzimática é feita entre 70 e 90°C (PARKIN, 2010).

A Figura 42 mostra o comportamento da atividade relativa em função da faixa de pH estudada.

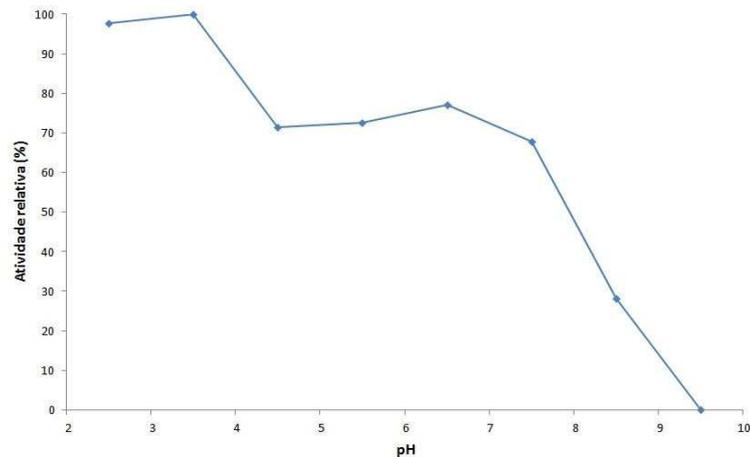


Figura 42 - Estabilidade da enzima poligalacturonase em relação ao pH

Pode ser observado que entre os pH de 2,5 e 3,5, a atividade relativa foi maior, permanecendo em aproximadamente 100%, caracterizando esta enzima como ácida. A atividade relativa foi igual a zero apenas no pH de 9,5.

Para a maioria dos processos industriais, as poligalacturonases produzidas por fungos são usadas em faixa de pH baixo (DALSENTER et al., 2005). Assim, o extrato enzimático estudado pode ser aplicado no processamento de sucos de frutas, como por exemplo, acerola (pH 3,3), laranja (pH 3,0), maçã (3,6), pêssego (pH 3,3) e uva (pH 3,1) (VENTURINI FILHO, 2010).

Souza et al. (2010) produziram poligalacturonases por fermentação semissólida utilizando, como agente fermentador, o fungo *Aspergillus niger* CCT0916 e, como substrato, a casca e albedo do maracujá. Esta enzima apresentou boa estabilidade até 50°C, apresentando 75% da estabilidade máxima. Quanto ao pH, a poligalacturonase produzida foi estável entre 3,5 e 5,5.

Com relação ao trabalho apresentado por Souza et al. (2010), apesar de ter sido usado o mesmo microrganismo, as características enzimáticas foram distintas. O fator promotor dessa diferença foi o substrato, pois com essa modificação, variáveis de processo, como temperatura de fermentação e umidade inicial do meio, serão automaticamente ajustadas para melhor produção enzimática. Além disso, a quantidade de massa de meio fermentado também promove ajustes no processo, como por exemplo, o ajuste temperatura de fermentação.

A enzima poligalacturonase é mais estável na temperatura de 40°C e em pH de 3,5. Assim, objetivou-se determinar por quanto tempo essa estabilidade permaneceria máxima (Figura 43).

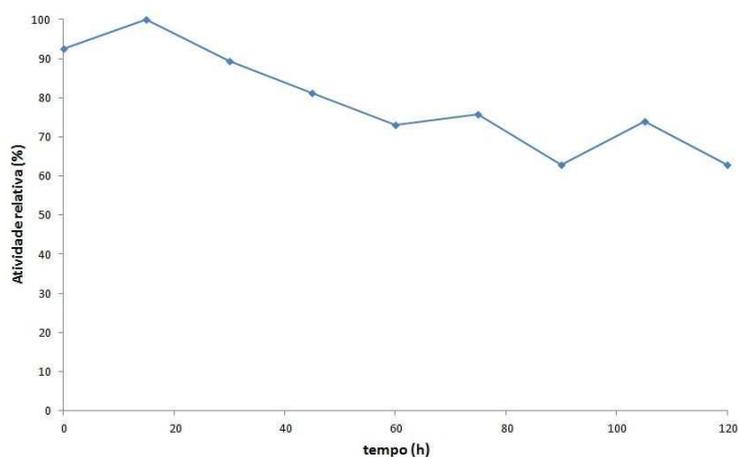


Figura 43 - Estabilidade da enzima poligalacturonase em função do tempo

Observa-se que durante o tempo de exposição (120 min) à temperatura e pH ótimo, a enzima manteve-se com até 70% de sua atividade. Com 30 minutos de exposição, a enzima permaneceu com 90% de sua atividade.

Barros et al. (2008) estudaram a utilização do processo de separação por membranas para garantir a conservação do suco de maracujá, mantendo a sua qualidade sensorial e nutricional. No pré-tratamento enzimático, utilizou-se a enzima comercial Pectinex Ultra SPL, nas concentrações de 150 e 300 ppm, por 60 min a 50°C, para posterior filtração.

Sandri et al. (2011) estudaram a eficiência das enzimas pectinolíticas produzidas em laboratório (*A. niger* T0005007-2 e *A. oryzae* IPT 301) e comerciais (Pectinex Clear e

Pectinex BE Color) na clarificação dos sucos de maçã, mirtilo e uva. As temperaturas dos ensaios foram 30 e 50°C por 30 e 60 min. Quando foram comparadas as diferentes condições para o tratamento, na maioria dos testes, ocorreu aumento de clarificação com maior de tempo de contato, sendo assim 60 min mostrou melhores resultados. Em relação à temperatura, não houve diferença dentro da faixa estudada.

De acordo com as características observadas, o extrato enzimático obtido através de fermentação semissólida, usando pedúnculo de caju como microrganismo e *Aspergillus niger* CCT0916, pode ser usado no processamento e clarificação de diversos tipos de frutas.

Capítulo 4

Extração de poligalacturonases com água

Após a fermentação através do processo semissólido, é necessária a extração da enzima do bolo fermentado. Na literatura, inúmeros trabalhos são encontrados com os mais diversos tipos de solventes, razões solvente/massa, tempo de contato e agitação. Um solvente bastante utilizado para extração enzimática é a água, já que esta substância é um solvente universal, de fácil acesso e aplicação. Assim, tem-se como objetivo o estudo da extração da enzima poligalacturonase, usando água como solvente. Utilizou-se o planejamento experimental fatorial, tendo como fatores o tempo de contato, a razão de solvente/massa de meio fermentado e a agitação.

4.1 – Extração de pectinases após processo de fermentação semissólida

Após a fermentação através do processo semissólido, é necessária a extração da enzima do bolo fermentado. Essa extração, também chamada de lixiviação, consiste na dissolução preferencial de um ou vários solutos de interesse por meio do contato entre um sólido e um solvente líquido (SOUSA et al., 2012).

A influência de diversas variáveis pode ser observada no processo de extração, tais como a preparação do sólido (meio fermentado), relação sólido/solvente, temperatura do processo, pH do solvente, graus de agitação do sistema, entre outros (SOUSA et al., 2012; FERNÁNDEZ, 2009).

A forma de extração depende, em muitos casos, dos tratamentos prévios a que os sólidos são submetidos, pois o soluto (enzima) não está na superfície do material. Geralmente, tais sólidos são triturados ou moídos com o objetivo de facilitar o contato entre o soluto e o solvente, incrementando a velocidade de transferência (FERNÁNDEZ, 2009).

A relação entre a quantidade de meio fermentado e o volume de solvente é de grande importância, pois a intensidade e o caráter do processo de extração sólido-líquido dependem da difusividade do soluto na fração do solvente selecionado e, depende também, da concentração de saturação do soluto no solvente, pois está diretamente relacionado com a força motriz do processo. Por outro lado, é necessário levar em consideração que um grande volume de solvente na extração aumenta consideravelmente os custos de purificação e recuperação do produto de interesse (processos de downstream) (FERNÁNDEZ, 2009).

Muitas vezes na indústria química, as extrações ocorrem em altas temperaturas para incrementar a solubilidade dos solutos no solvente e facilitar a difusividade do soluto no líquido. No caso dos produtos naturais e biológicos, como as enzimas, o incremento excessivo da temperatura afeta a qualidade do produto extraído e a extração de produtos indesejáveis. Deve-se estabelecer, então, um equilíbrio entre as propriedades físico-químicas do solvente e as propriedades bioquímicas dos solutos (FERNÁNDEZ, 2009).

Além disso, Sousa (2010) enfatiza que a extração deve ser realizada em valores de temperatura e pH iguais a estabilidade ótima da enzima e sua atividade biológica seja,

portanto, elevada durante o processo para reduzir a probabilidade de danos às biomoléculas.

Não há uma metodologia padronizada para extração de enzimas obtidas por fermentação semissólida. Na literatura, inúmeros trabalhos são encontrados com os mais diversos tipos de solventes, razões solvente/massa, tempo de contato e agitação. Abaixo se encontram descritos alguns trabalhos:

Rocha (2010) produziu diversas enzimas, inclusive pectinases, usando *Aspergillus niger* ATCC 16404, empregando como substratos resíduos das indústrias de processamento de arroz e maracujá. A extração das enzimas foi feita usando 200 mL de água destilada e 4 mL de tween 80, em meio com 30 g de substrato. Agitação manual por 5 min e posterior filtração em papel de filtro Quanty Cinza-007, diâmetro de 11 cm.

Al-Najada et al. (2012) produziram poligalacturonases usando casca de banana e pêsego, como substrato, e os microrganismos *F. oxysporum* e *A. tubingensis*. O extrato cru foi obtido usando tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,2. Em seguida, foi realizada a centrifugação em 10.000 rpm por 12 min.

Padma et al. (2012) produziram poligalacturonases usando *Aspergillus awamori* MTCC 9166 e cascas de maçã, laranja, manga e abacaxi, como substrato. A extração da enzima foi realizada usando tampão acetato pH 5.2.

Sousa et al. (2012) estudaram o processo de extração da enzima poligalacturonase, obtida através de fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá-amarelo, usando *Aspergillus niger* CCT 0916. Foi observado a influência das variáveis agitação, tempo de contato e relação solvente/massa, usando tampão acetato de sódio 200 mM pH 4,5, como solvente e temperatura de extração igual a 35°C. As melhores condições foi o tempo de contato de 45 min, agitação de 50 rpm e relação solvente/massa de 10:1 mL/g, sendo a relação solvente/massa a variável que mais influenciou a atividade poligalacturonásica dos extratos.

Outro solvente bastante utilizado para extração enzimática é a água, já que esta substância é um solvente universal, de fácil acesso e aplicação.

4.2 – Estado da arte: extração enzimática com água

Vários autores têm estudado processo fermentativo semissólido, contudo, a metodologia para extração de pectinases do bolo fermentado ainda não é consolidada. Dentre os fatores mais importantes nesse tipo de estudo têm-se o tipo de solvente, a temperatura em que a extração ocorrerá e o tempo de contato.

Fontana et al. (2005) estudaram a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido contendo farelo de trigo, sais e diferentes concentrações de glicose e pectina. Estes autores utilizaram para extração do complexo enzimático um volume de 15 mL de água para 2,7 g de meio cultivado, previamente macerado. Após 30 min de agitação recíproca a 200 rpm, a suspensão foi centrifugada e o caldo utilizado para a determinação da atividade enzimática.

Silva et al. (2005) produziram exo-poligalacturonases e pectinaliase com *P. viridicatum* RFC3 através da fermentação semissólida, tendo como substratos bagaços de banana e cana, cascas de manga e banana, farelo de trigo além da polpa de maçã e tegumento do grão de milho. As enzimas foram extraídas pela adição de 8 mL de água por grama de substrato, o qual foi homogeneizado e mantido sob agitação a 100 rpm por 30 min.

Martin (2006) isolou e identificou linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases, dentre elas *Aspergillus sp.*, e cultivou-as em farelo de trigo, bagaço de laranja industrializado, bagaço de cana-de-açúcar e casca de laranja lavada por fermentação em estado sólido. Para extração enzimática, foi utilizada uma razão de 8 mL de água destilada para cada grama de fermentado, sendo, após homogeneização, agitado por 30 min em shaker a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado e o sobrenadante, utilizado como solução enzimática bruta.

Maller (2008) avaliou a produção de diversas fontes de carbono sobre a produção de pectinases em meio sólido com *Aspergillus niveus*. Para extração enzimática, utilizou-se água destilada, a uma razão de 12,5 mL/ g de substrato, sob agitação por 30 min.

4.3 – Materiais e métodos

4.3.1 – Processo fermentativo

A fermentação ocorreu de acordo com metodologia descrita no item 2.4.3 (Capítulo 2) deste trabalho, sob condições ótimas: 50 %b.u de umidade inicial no meio, 10^6 esporos/g de concentração de inóculo, 1,5 %(m/m) de concentração de sulfato de amônio, 40 mm de espessura da camada de substrato, temperatura de fermentação igual a 23°C e 69 horas de fermentação.

4.3.2 – Extração enzimática e atividade poligalacturonásica

Após fermentação, 10 g de meio foram colocados em erlemmeyers de 250 mL e acrescentado água destilada, seguindo a razão de volume de solvente por grama de substrato sólido definida pelo planejamento experimental (item 4.3.3). Em seguida, foi levado para agitação em shaker com rotação e tempo de contato também definidos segundo planejamento (item 4.3.3). A temperatura de incubação foi igual a 30°C. As amostras foram filtradas com papel Whattmam 1, para separação dos esporos.

A quantificação da atividade enzimática nos extratos da fermentação foi realizada conforme metodologia descrita no item 1.6.6 (Capítulo 1) deste trabalho.

4.3.3 – Planejamento experimental 2^3 + DCCR: extração com água

Para determinação das condições ótimas de extração, foi realizado um planejamento experimental 2^3 com delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como fatores o tempo de contato (te), razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido (R) e a rotação do shaker (θ), e como resposta a atividade poligalacturonásica (PG).

No planejamento, foi considerado para cada variável de entrada um nível inferior (-1), um superior (+1), um ponto central (0), um nível inferior rotacional ($-\alpha$) e um nível superior rotacional ($+\alpha$), compondo assim a matriz de planejamento. Foram feitas 3

repetições no ponto central.

Com os resultados obtidos na execução do planejamento experimental fatorial, foi realizada regressão dos dados para obtenção de um modelo empírico. A validação do modelo foi feita através do Teste F para verificar se este foi significativo ao nível de confiança fixado. Por fim, a superfície de resposta foi construída. Os cálculos desta seção foram realizados com o auxílio do programa Statistica.

Na Tabela 19 encontram-se os valores dos níveis das variáveis do planejamento experimental.

Tabela 19 – Níveis das variáveis para extração enzimática

Variáveis	- 1,68	-1	0	+1	+1,68
te (min)	5	15	30	45	55
θ (rpm)	16	50	100	150	184
R (mL/g)	2	5	10	15	18

Na Tabela 20 encontra-se a matriz de planejamento.

Tabela 20 – Matriz do planejamento experimental fatorial $2^3 + DCCR$

Ensaio	te*	θ^*	R*
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

(*) variáveis codificadas

4.4 – Resultados e discussão

Uma atividade poligalacturonásica padrão foi inicialmente feita com o bagaço fermentado utilizado nestes experimentos, seguindo metodologia descrita no item 1.6.6. O extrato para realização desta atividade enzimática foi obtido de acordo com o item 1.6.5 (Capítulo 1). Observou-se que a atividade enzimática padrão foi igual a 5,11 U/g.

Com a realização dos experimentos de extração com água, observou-se que a maior atividade poligalacturonásica 6,89 U/g foi obtida sob as condições de tempo de contato igual a 45 min, rotação do shaker igual a 150 rpm e razão de solvente e massa de

meio fermentado igual a 5 mL/g. Este valor de atividade poligalacturonásica foi 35% maior do que o valor da atividade poligalacturonásica padrão obtida.

A partir da regressão dos dados de atividade poligalacturonásica e os valores dos fatores estudados, construiu-se um modelo com 95% de confiança (Equação 9). Lembrando que a validação do modelo foi feita através do Teste F.

$$PG = 0,30 + 1,11te + 0,96te^2 + 0,28\theta + 0,81\theta^2 + 0,30R + 0,69R^2 + 1,71te\theta + 0,32teR - 0,22\theta R$$

(9)

O coeficiente de determinação (R^2) obtido para essa equação foi igual a 0,8485. O F calculado foi igual a 4,357 e o Teste F foi igual a 1,184. Sendo o Teste F maior que 1, então, o modelo empírico obtido (Equação 9) é estatisticamente significativo, com 95% de confiança.

A Tabela 21 apresenta a ANOVA para verificação estatística do modelo empírico (Equação 9).

Tabela 21 - Análise de variância para a Equação 9

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	58,860	9	6,54	1,184
Resíduo	10,510	7	1,501	
Total	69,367	16		
R^2	0,8485			
$F_{tab} 95\%$				3,68

As Figuras 44 a 46 indicam o perfil da curva que representa o efeito sinérgico dos fatores tempo de contato (te), rotação (θ) e razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido (R) sobre a resposta atividade poligalacturonásica.

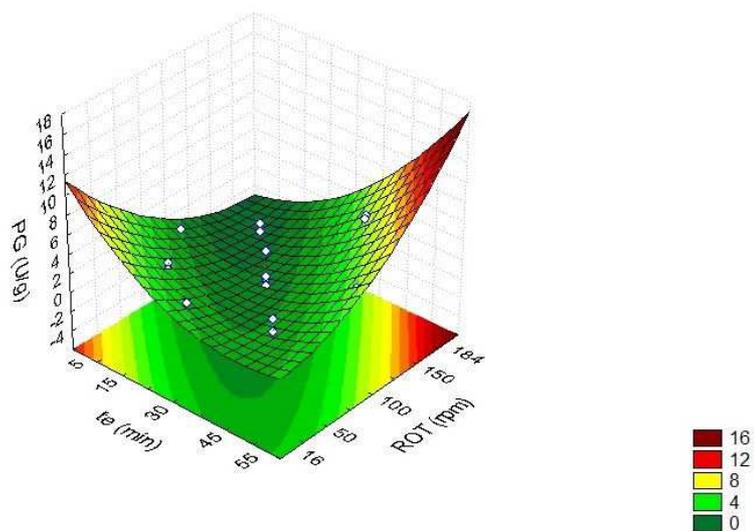


Figure 44 – Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica: influência do tempo de contato (t_e) e da rotação do shaker (θ)

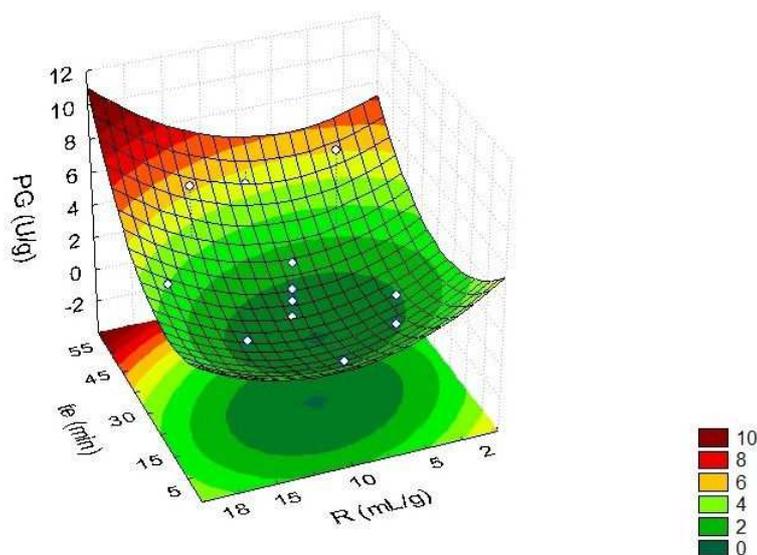


Figure 45 – Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica: influência do tempo de contato (t_e) e razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido (R)

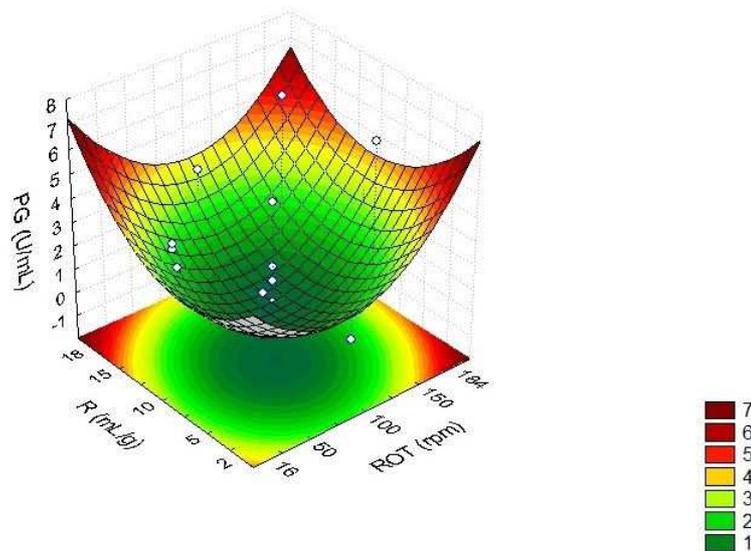


Figure 46 – Superfície de resposta para a atividade poligalacturonásica: influência da razão de volume de solvente por gramas de substrato sólido (R) e rotação do shaker (θ)

O maior ponto de atividade enzimática calculado pelo modelo (16 U/g) foi encontrado com todas as variáveis independentes no nível superior, ou seja, rotação igual a 184 rpm, tempo de contato igual a 55 min e razão R igual a 18 mL/g. Observa-se que essa atividade calculada pelo modelo é 200% maior que a atividade padrão obtida para o bagaço utilizado.

Segundo o gráfico de Pareto (Figura 47), os fatores que influenciaram de forma significativa o processo de extração usando como solvente a água foram o tempo de contato (t_e) e a rotação (θ).

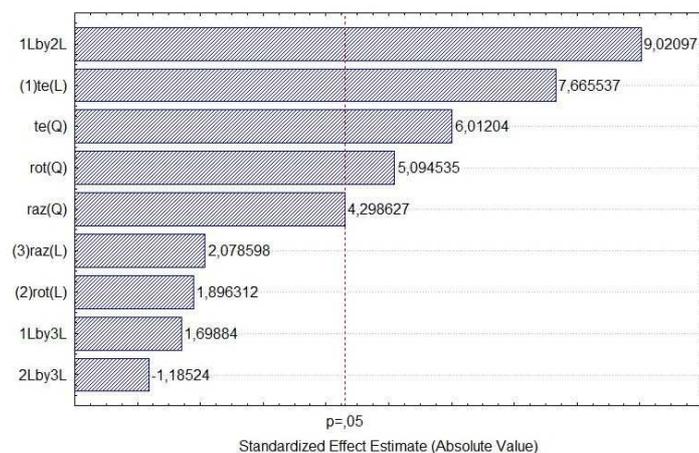


Figura 47 - Gráfico de Pareto para extração enzimática com água

As superfícies de resposta (Figuras 44 a 46) ainda mostram que uma região de mínimo foi alcançada, com a realização do planejamento experimental. Isto confirma a necessidade de ampliação da faixa de níveis do planejamento estudado, compondo assim um novo estudo, em busca da região de otimização.

Observa-se a necessidade de padronização na extração das enzimas fermentadas através do processo de fermentação semissólida. A otimização dessa extração pode aumentar consideravelmente o rendimento do processo fermentativo. Fica assim, a sugestão de trabalhos a serem realizados futuramente.

Capítulo 5

Aplicação do extrato enzimático na clarificação do suco do maracujá

Observa-se crescimento no consumo de sucos de frutas tropicais no Brasil e no mundo. Estes sucos atendem aos requisitos de consumidores que têm se preocupado cada vez mais com a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos, pois são ricos em vitaminas, sais minerais, açúcares e substâncias antioxidantes. Assim, faz-se necessário que as técnicas de processamento e conservação de sucos sejam eficazes em manter nos produtos processados industrialmente, as características originais das frutas. Com isso, objetivou-se a aplicação do extrato enzimático obtido por fermentação semissólida no suco tropical de maracujá, observando a variação de alguns parâmetros importantes para conservação da qualidade do mesmo.

5.1 – Sucos de frutas tropicais

Segundo o decreto nº 6.871 (BRASIL, 2009), o suco de fruta tropical é a bebida não fermentada obtida pela dissolução, em água potável ou em suco clarificado de fruta tropical, da polpa de fruta polposa de origem tropical, por meio de processo tecnológico adequado, devendo ter cor, aroma e sabor característicos da fruta, submetido a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

Os consumidores de alimentos industrializados têm se preocupado cada vez mais com a qualidade nutricional e sensorial dos mesmos, demandando produtos nutritivos, saborosos e que não contenham conservantes químicos. Os sucos de frutas tropicais atendem a estes requisitos por serem ricos em vitaminas, sais minerais, açúcares e substâncias antioxidantes, além de proporcionarem sabor e aroma agradáveis. Assim, é necessário que as técnicas de processamento e conservação de sucos sejam eficazes em manter nos produtos processados, as características originais das frutas (CIANCI et al., 2005).

No Brasil, o consumo de sucos, em 2003, foi de aproximadamente 2,2 bilhões de litros, nas mais diferentes formas. Destes, 579 mil litros são de sucos integrais, com destaque para o caju (51%) e o maracujá (24%) (PINHEIRO et al., 2006).

5.2 – Maracujá: fruta e derivados

O termo maracujá refere-se a várias espécies do gênero *Passiflora* L. da família *Passifloraceae*. É a denominação genérica de cerca de 500 espécies de maracujá, a maioria nativa da América Tropical (MAIA et al., 2007).

A produção brasileira de maracujá foi de 615,2 mil toneladas em 2006. Seu cultivo estende-se por todos os estados brasileiros e pelo Distrito Federal, sendo a região Nordeste a maior produtora, tendo a Bahia como principal estado produtor, com cerca de 34% da produção nacional. Estima-se que metade da produção brasileira seja utilizada na fabricação de suco concentrado congelado, e a outra metade, para o consumo *in natura*. O Brasil também é um dos principais exportadores de suco dessa fruta, cujos produtos

mais comercializados são o suco integral congelado e o suco concentrado congelado (SILVA et al., 2005; VENTURINI FILHO, 2010).

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) é a espécie mais importante e a mais cultivada no mundo. Além da extração para produção de suco, podem também ser aproveitadas suas sementes para extração do óleo utilizado em cosméticos, e sua casca para ração (VENTURINI FILHO, 2010).

A indústria brasileira, consciente do potencial produtor de frutas do país, está se beneficiando da tecnologia para investir num mercado cada vez mais em expansão: o de suco pronto (MAIA et al., 2007).

Dentre as principais características químicas do suco integral de maracujá amarelo citam-se o pH entre 2,7 e 3,1, o teor de sólido solúveis totais de 14,9% a 18,6% e acidez de 4,9%. Os açúcares redutores são os principais componentes dos sólidos solúveis totais do suco do maracujá. No maracujá amarelo, os açúcares redutores são constituídos por 32,4% de glicose, 38,1% de sacarose e 29,4% de frutose (MAIA et al., 2007).

Maia et al. (2007) citaram análises dos ácidos orgânicos não voláteis no suco de maracujá amarelo e roxo, e constataram que o ácido cítrico é o predominante, porém as quantidades entre as espécies são diferentes.

O teor de ácido ascórbico no suco, um dos indicadores do valor nutritivo do maracujá, é muito variável segundo o local de produção, estágio de desenvolvimento, amadurecimento, temperatura de armazenamento e fotoperiodismo. Os teores de vitamina C podem variar entre 20 e 40 mg/100 mL (MAIA et al., 2007).

5.3 – Clarificação de sucos de frutas

A aparência de bebidas é fundamental para a aceitação do consumidor, fazendo com que a manutenção de dispersões de partículas coloidais ou outras entidades seja uma consideração importantíssima em relação a esses produtos. O aumento da viscosidade para estabilização da aparência não é prático nem adequado (LINDSAY, 2010).

Suco de frutas é o produto derivado principal para algumas frutas, que são bem aceitas pelo consumidor devido ao sabor e valores nutricionais. De acordo com cada propriedade química e física de cada fruta, seus respectivos sucos apresentam diferenças

no grau de turbidez. A turbidez nos sucos ocorre devido à presença de materiais insolúveis, como fragmento de células originadas da polpa e/ou componentes que não se dissolvem completamente. O uso de enzimas pode aumentar o rendimento e ajudar na clarificação de diversos sucos (RIBEIRO et al., 2010).

As pectinases hidrolisam as pectinas produzindo complexo pectina-proteína por floculação. O suco resultante, após a ação enzimática, terá uma quantidade menor de pectina, reduzindo assim a viscosidade. Esse processo de despectinização é importante, pois facilitará os processos de filtração subsequentes, já que essa substância causa entupimento das membranas e, conseqüentemente, diminuição do fluxo (ABDULLAH et al., 2007).

As pectinas também tem papel importante na formação de turbidez nos sucos. As proteínas e as substâncias pécticas participam, junto com os polifénois, da formação dos coloides promotores da turbidez. Enzimas específicas têm sido utilizadas para a hidrólise parcial de proteínas de alto peso molecular e, portanto, para redução das tendências de formação de turbidez (LINDSAY, 2010).

Vários estudos têm reportado a despectinização dos sucos de frutas usando tratamento enzimático com pectinases na extração e clarificação.

Lima (2006) estudou as condições temperatura de fermentação, concentrações de substrato, idade e tamanho do inóculo e pH do meio nas produção e atividade de endopoligalacturonases, exopoligalacturonases e pectinesterases por *Aspergillus tubingensis* Luc40F4C1 isolado de solo de Urucu (Amazonas/BR). Além disso, foi estudado também o processo de clarificação do suco de camu-camu (*Myciaria dúbia* H.B.K. McVaugh) com extrato enzimático. Após certificação de ausência de toxicidade, foi inoculada alíquota de uma suspensão celular em meio líquido suplementado com pectina cítrica, em triplicata. O extrato enzimático foi dialisado para determinação da atividade pectinolítica. As maiores atividade enzimáticas foram obtidas nas seguintes condições: inóculo – 10^6 esporos/mL de meio, culturas com 5 dias de crescimento, a 30°C, pectina cítrica 1 %(p/v). O extrato enzimático analisado conferiu ao suco do camu-camu: clarificação e redução da viscosidade do conteúdo de pectina e polpa residual.

Abdullah et al. (2007) empregaram a metodologia de superfície de resposta na análise simultânea dos efeitos das condições de tratamento enzimático do suco de

carambola, considerando as variáveis tempo de incubação, temperatura de incubação e concentração enzimática sobre as características físicas turbidez, limpidez, viscosidade e cor. O suco de carambola foi tratado com o complexo comercial Pectinex Ultra SP-L, com atividade poligalacturonásica igual a 26000 U/mL, considerando as seguintes faixas no planejamento experimental: tempo de incubação (20 – 100 min), temperatura de incubação (30 – 50°C) e concentração enzimática (0,01 – 0,1 %v/v). Os resultados indicaram que a concentração enzimática é a variável mais significativa. As condições de tratamento enzimático recomendadas foram 0,1% da concentração enzimática sob temperatura de 30°C por 20 min.

Barros et al. (2008) estudaram a utilização da separação por membrana para garantir a conservação do suco de maracujá, mantendo a sua qualidade sensorial e nutricional. O processo foi desenvolvido com as seguintes etapas: centrifugação; tratamento enzimático e microfiltração; e análises de qualidade. A polpa integral de maracujá foi centrifugada, obtendo-se o sobrenadante e o sedimentado, do qual analisou suas características físico-químicas. Com o sobrenadante fez-se o tratamento enzimático com a enzima Pectinex Ultra SPL e após alimentou-o numa membrana tubular cerâmica de microfiltração, com diâmetro de poro de 0,3 μ m, conseguindo o suco clarificado. Obteve-se o melhor resultado na condição de operação de 0,5 bar de pressão transmembrana e concentração de 150 ppm de enzima. Os produtos obtidos do processamento foram analisados e os parâmetros avaliados seguiram como esperado.

Oliveira et al. (2012) estudaram a performance de duas membranas: cerâmica tubular e fibra oca de poliamida, sob pressão através da membrana de 0,5 e 1 bar, para clarificação da polpa de maracujá pré-tratada por centrifugação e tratamento enzimático (Pectinex SP-L) nas concentrações de 150 e 300 ppm. As qualidades nutricionais e sensoriais do suco clarificado foram avaliadas. Não se observou alterações significativas. Observou-se que a condição mais adequada para clarificação dessa polpa foi com tratamento enzimático com 150 ppm e, posterior microfiltração com membrana tubular de 0,3 μ m com pressão de 0,5 bar.

5.4 – Materiais e métodos

5.4.1 – Processo fermentativo

A fermentação ocorreu de acordo com metodologia descrita no item 2.3.3 (Capítulo 2) deste trabalho, sob condições ótimas: 50 %b.u de umidade inicial no meio, 10^6 esporos/g de concentração de inóculo, 1,5 %(m/m) de concentração de sulfato de amônio, 40 mm de espessura da camada de substrato, temperatura de fermentação igual a 23°C e 69 horas de fermentação.

5.4.2 - Extração de enzimas

A extração das enzimas do fermentado foi feita seguindo resultados obtidos no Capítulo 4 deste trabalho.

Após fermentação, amostras de 10 g de meio fermentado foram colocadas em erlenmeyers de 250 mL e acrescentado água destilada. A razão de volume de solvente por grama de substrato sólido definida foi igual a 15 mL/g. Em seguida, foram levadas para agitação em shaker com rotação igual a 45 rpm e tempo de contato igual a 15 min. A temperatura de incubação foi igual a 30°C. As amostras foram filtradas com papel Whattmam 1, para separação dos esporos.

A atividade poligalacturonásica do extrato obtido foi igual a 6,72 U/g (item 1.6.6).

5.4.3 – Obtenção do suco de maracujá

Foram utilizados maracujá amarelos para produção do suco, adquiridos na Empresa de Abastecimento de Serviços Agrícolas (EMPASA) de Campina Grande - PB. Os mesmos foram lavados em água clorada e, em seguida, em água corrente.

A polpa da fruta com semente foi levada para liquidificador industrial, onde foram acrescentados 50 %(m/m) de água destilada, seguindo legislação brasileira, que permite a dissolução da polpa para fabricação de sucos prontos (BRASIL, 1997). Em seguida, foi feita

a separação dos pedaços de polpa e sementes do suco. O suco obtido foi armazenado sob refrigeração.

5.4.4 - Caracterização do suco *in natura*

As seguintes análises foram realizadas para o suco de maracujá *in natura*:

As análises de pH, sólidos solúveis e açúcares redutores totais encontram-se descritas no item 1.6.2 (Capítulo 1) deste trabalho.

A limpidez dos sucos foi determinada por medida de absorvância a 660 nm, usando espectrofotômetro e água destilada como referência (ABDULLAH et al., 2007).

5.4.4.1 – Pectina em líquidos

A fração de pectina das amostras de suco foi determinada com base na neutralização das cargas dos resíduos de ácido galacturônico livre pelos íons cálcio, provocando a geleificação da pectina e sua precipitação, segundo Carvalho et al. (2006).

Pipetou-se 100 mL de amostra em Becker de 1 L. Acrescentou-se 400 mL de água destilada. Ferveu-se lentamente durante 1 h, recolocando a água perdida por evaporação. Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso para esfriar.

Com as amostras em temperatura ambiente, as mesmas foram filtradas com algodão. Um balão volumétrico foi usado para averiguar o volume das amostras para 500 mL.

Alíquotas de 100 mL foram pipetadas e colocadas em Becker de 1 L. Foram adicionados 300 mL de água destilada e 10 mL de hidróxido de sódio 1 N, agitando continuamente. As amostras foram deixadas em repouso por uma noite.

Após o longo período de repouso, foi adicionado 50 mL de solução de ácido acético 1 N. Após 5 minutos, foi adicionado solução de cloreto de cálcio 2 N, sob agitação. As amostras repousaram por pelo menos 1 h, para precipitação do pectato. Em seguida, foram filtradas em papel filtrado quantitativo.

As amostras foram lavadas com água destilada quente, até remoção de todo cloreto livre. Testes com solução de nitrato de prata 1% foram realizados no filtrado. As

amostras foram levadas a estufa a 100°C por 3 h. Após esse período, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente em dessecador e pesadas.

A pectina foi expressa em percentagem de pectato de cálcio através da Equação 10.

$$\% \text{ pectato de cálcio} = \frac{\text{massa do pectato de cálcio}}{\text{mL da amostra}} \times 100 \quad (10)$$

5.4.4.2 – Acidez total

O teor de acidez foi determinado por titulação com NaOH 0,1 N usando fenolftaleína, segundo Brasil (2005).

Alíquotas de 5 mL foram diluídos em 25 mL de água destilada, em erlemmeyer de 125 mL. Adicionou-se 2 gotas de solução de fenolftaleína 1%. E procedeu-se a titulação, com agitação constante da amostra, até coloração rósea.

A acidez total foi expressa percentagem de ácido cítrico, segundo Equação 11.

$$\text{Acidez}(\%) = \frac{V \times \text{eq.g} - \text{ácido} \times 100}{P} \quad (11)$$

Em que: V = volume de NaOH gasto na titulação (mL);

P = mL da amostra titulada;

Eq.g ácido = equivalente grama do ácido expresso (ácido cítrico = 64,04);

5.4.5 – Tratamento enzimático do suco

Para o tratamento enzimático, 200 mL de suco *in natura* foram levados em erlenmeyers a banho-maria. A temperatura do banho, tempo de incubação e concentração enzimática foi seguida segundo planejamento experimental (item 5.4.5.1). Para inativação das enzimas, após o tempo de incubação, as amostras de sucos foram pasteurizadas a 90°C por 5min. Em seguida, foram filtradas em papel Whattman 1 (ABDULLAH et al., 2007).

Foram realizadas análises de pH, acidez total, açúcares reductores totais, quantidade de pectina e limpidez no suco processado (item 5.4.5).

5.4.5.1 – Planejamento experimental: melhor condição para o tratamento enzimático

Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 completo, onde os fatores observados foram a temperatura (T), tempo de incubação (t) e o volume de enzimas (Ve). As respostas observadas foram o pH, acidez total (AT), açúcares reductores totais (ART), quantidade de pectina (QP) e limpidez (L).

No planejamento foi considerado para cada variável de entrada um nível inferior (-1), um superior (+1) e um ponto central (0), compondo assim a matriz de planejamento. Foram feitas 4 repetições no ponto central.

Com os resultados obtidos na execução do planejamento experimental fatorial, foi realizada regressão dos dados para obtenção de um modelo empírico. O modelo foi validado através do Teste F para verificar se este foi significativo ao nível de confiança fixado. Por fim, a superfície de resposta foi construída. Os cálculos desta seção foram realizados com o auxílio do programa Statistica.

Na Tabela 22 encontram-se os valores dos níveis das variáveis do planejamento experimental.

Tabela 22 – Níveis das variáveis para processamento do suco de maracujá

Variáveis	Nível (-1)	Ponto Central (0)	Nível (+1)
T (°C)	30	40	50
t (min)	20	60	100
Ve (% v/v)	0,05	0,1	0,15

Na Tabela 23 encontra-se a matriz de planejamento.

Tabela 23 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2³

Ensaio	T*	t*	Ve*
1 (4)	-1	-1	-1
2 (8)	+1	-1	-1
3 (1)	-1	+1	-1
4 (6)	+1	+1	-1
5 (9)	-1	-1	+1
6 (7)	+1	-1	+1
7 (3)	-1	+1	+1
8 (2)	+1	+1	+1
9 (11)	0	0	0
10 (10)	0	0	0
11 (5)	0	0	0
12 (12)	0	0	0

5.5 – Resultados e discussão

5.5.1 – Caracterização do suco de maracujá *in natura*

Na Tabela 24 abaixo, encontram-se os resultados obtidos para a caracterização do suco de maracujá *in natura*.

Tabela 24 - Caracterização do suco de maracujá amarelo

Parâmetros	Unidade	Valor
pH	---	2,82 ± 0,02
SS	°Brix	5,92 ± 0,14
ART	g/100g	18,27 ± 0,0
QP	%pectato de cálcio	0,23 ± 0,0
AT	%ácido cítrico	3,55 ± 0,07
L	Abs 660 nm	1,81 ± 0,007

Comparando o valor de pH encontrado com a literatura, observa-se que este encontra-se muito próximo do reportado por Paula et al. (2004), que observaram valor igual a 2,9, para o suco integral de maracujá. O valor de °Brix encontra-se abaixo, devido à diluição que foi feita com o suco de maracujá apresentado. E o valor de ART foi o dobro do reportado por esse mesmo autor, mesmo com a diluição.

Domingues et al. (2012) observaram que a limpidez (Abs 540 nm) foi igual a 3,83 e o teor de sólidos solúveis foi igual a 11,8 °Brix para o suco obtido a partir da polpa da fruta de maracujá.

Pinheiro et al. (2006) caracterizaram diversos sucos integrais de maracujá disponíveis no mercado e observaram que os valores de pH encontravam-se na faixa entre 2,72-3,17; °Brix entre 12,5 – 13,3; acidez total entre 2,96-4,02; e açúcares redutores entre 2,7-7,3, observando-se assim uma faixa muito ampla de valores para tais parâmetros.

Não foram encontrados dados na literatura que permitissem a comparação dos valores de pectina com sucos produzidos a partir do maracujá.

O regulamento técnico, fixado pelo decreto nº 2.314 (BRASIL, 1997), determina as características do suco tropical de maracujá não adoçado, constando que o teor de sólidos solúveis deve ter um mínimo de 6,0 °Brix, acidez total no mínimo igual a 1,25 g/g ácido cítrico e açúcares totais de no máximo 9,00 g/100g.

O suco obtido neste trabalho encontra-se dentro dos parâmetros observados na legislação brasileira vigente, com exceção da concentração de açúcares que se encontra 2 vezes maior.

É importante lembrar que, de forma geral, a caracterização feita para as culturas e seus derivados pode variar drasticamente dependendo da época de colheita, dos fenômenos e práticas agrícolas relacionados com o plantio, do tipo de solo, etc. (ALCÂNTARA et al., 2007; MAIA et al., 2007).

5.5.2 – Melhor condição para o tratamento enzimático

Através da aplicação do planejamento experimental 2³, objetivou-se a influência das variáveis temperatura (T), tempo de incubação (t) e o volume de enzimas (Ve) sobre as respostas pH, acidez total (AT), açúcares redutores totais (ART), quantidade de pectina (QP) e limpidez (L).

Observou-se que para a acidez total e pH não correram variações significativas dos valores entre os ensaios, ficando entre 3,56-3,65 e 2,78-2,92, respectivamente. Valores estes muito próximos do observado para o suco de maracujá *in natura* (3,55 %ácido cítrico e 2,82, respectivamente).

Para a concentração de açúcares redutores (ART), observou-se que alguns ensaios sofreram variações nos seus valores. Os ensaios 3, 5, 6 e 10 apresentaram valores abaixo do observado para o suco *in natura*, valores entre 13,02 e 13,14. Não foi observado um padrão para a influência de tal variação. Os demais ensaios obtiveram valores de ART próximos aos observados para o suco *in natura*.

Para a quantidade de pectina, com exceção do ensaio 4, que permaneceu com a mesma quantidade do suco *in natura*, todos os demais ensaios tiveram sua quantidade de pectina reduzida após a aplicação do complexo enzimático. Os ensaios com o volume de enzimas iguais a 0,15 %(v/v) (ensaios 5, 6, 7, e 8) tiveram a quantidade de pectina reduzida para a faixa de 0,110 - 0,140, uma redução de aproximadamente 45%. A quantidade de pectina dos pontos centrais ficou na faixa de valores entre 0,011-0,033, uma redução de aproximadamente 90%. E os ensaios 1, 2 e 3, com volume de enzima igual a 0,05 %(v/v), apresentaram valores iguais a 0,033, 0,011 e 0,070, respectivamente.

Uma redução da quantidade de pectina de aproximadamente 85%, 95% e 70%, respectivamente. Pode-se observar que, com uma menor quantidade de enzima e mesmo tempo de contato, porém em maior temperatura, ocorreu maior redução na quantidade de pectina. Portanto, o ensaio 2 apresentou a maior redução na quantidade de pectina 95%, sob as condições: $T = 50^{\circ}\text{C}$, $t = 20 \text{ min}$ e $V_e = 0,05 \text{ \%}(v/v)$.

Paula et al. (2004) objetivaram a obtenção de suco de maracujá, utilizando técnica de microfiltração, com pré-tratamento enzimático, visando aumentar a eficiência do processo pela redução da viscosidade. Foram testadas três enzimas comerciais: Pectinex Ultra SP L, Thermamyl Liquid 60 e Biopectinase MB. Os resultados não mostraram diferenças significativas quanto ao teor de sólidos solúveis, pH e acidez das amostras de suco hidrolisado em relação ao suco integral. Observou-se efeito positivo da ação das enzimas na redução da viscosidade.

A partir da regressão dos dados de acidez total, pH, açúcares redutores e quantidade de pectina e dos valores dos fatores estudados, construíram-se modelos de primeira ordem com 95% de confiança, para verificar a influência dos fatores sobre as respostas (Tabela 25).

A validação do modelo foi feita usando o Teste F. O F tabelado foi igual a 4,95. Quando esta razão é maior do que 1, a regressão é estatisticamente significativa. Para uma regressão não apenas estatisticamente significativa, mas também preditiva, o valor da razão entre os dois F's deve ser maior que 4 (BARROS NETO et al., 2010).

Em relação ao coeficiente de determinação (R^2), sabe-se que o maior valor possível é 1, significando que entre a curva e os pontos experimentais não existe nenhum resíduo e toda a variação em torno da média é explicada pela regressão (SANTOS et al., 2008).

Tabela 25 - Modelos empíricos para as respostas no processo de aplicação de enzimas em suco de maracujá

Modelos empíricos	R ²	F cal	Teste F
AT = 3,61 + 0,006T + 0,016t + 0,011Ve – 0,001Tt – 0,006TVe + 0,004tVe	0,4726	0,747	0,151
pH = 2,84 – 0,020T + 0,015t – 0,0125Ve – 0,002Tt – 0,005TVe + 0,030tVe	0,6188	1,353	0,273
L = 0,084 + 0,039T + 0,022t – 0,016Ve – 0,012Tt – 0,023TVe + 0,004tVe	0,8653	5,360	1,080
ART = 16,87 + 0,80T + 0,50t – 0,82Ve + 0,82Tt – 0,45TVe + 1,85tVe	0,6884	1,841	0,372
QP = 0,079 + 0,019T + 0,026t + 0,018Ve + 0,024Tt – 0,018TVe – 0,040tVe	0,5739	1,120	0,227

De todas as respostas observadas com a execução dos experimentos, apenas a limpidez apresentou equação estatisticamente significativa, com 95% de confiança. Assim como os coeficientes em negrito nas equações.

Para confirmar e detalhar os cálculos estatísticos feitos para o modelo empírico, na Tabela 26 apresenta-se a ANOVA para verificação estatística do modelo para a limpidez.

Tabela 26 - Análise de variância para a equação da limpidez

	SQ	gl	MQ	Teste F
Regressão	0,023	6	0,004	1,080
Resíduo	0,004	5	0,0007	
Total	0,027	11		
R ²	0,8653			
F _{tab} 95%				4,95

A Figura 48 indica o perfil da curva que representa o efeito sinérgico dos fatores estudados sobre a resposta. Estas figuras mostram a influência da temperatura de hidrólise (T), tempo de contato (t) e volume de enzimas (Ve) sobre a resposta limpidez (L).

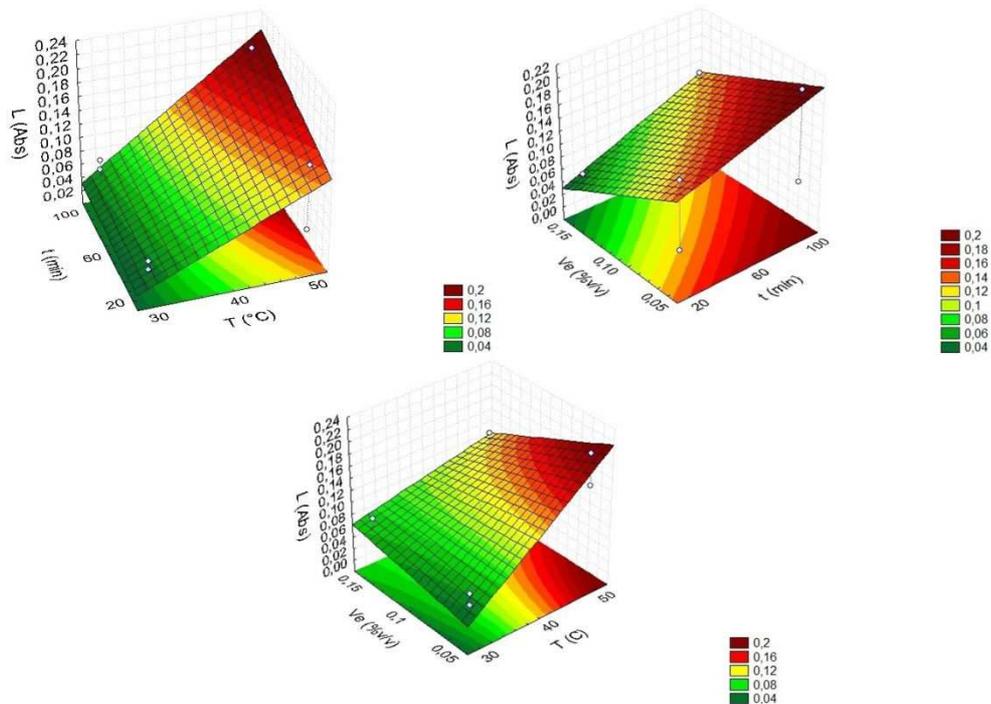


Figura 48 – Superfícies de resposta para limpidez do suco de maracujá

Como visto anteriormente, a limpidez do suco é um dos parâmetros para quantificar a clarificação do suco tratamento com enzimas. Quanto menor o valor da absorbância, mais clara estará a amostra, conseqüentemente estará mais límpida. Ou seja, os valores de maior importância para o estudo e constatação da clarificação do suco de maracujá correspondem aos menores valores de limpidez. Assim, os valores destacados em verde nas superfícies da Figura 48, são os valores de interesse para este estudo. Especificadamente, o menor valor de limpidez calculado pelo modelo foi 0,04, sob as condições: $T = 30^{\circ}\text{C}$, $t = 20 \text{ min}$ e $V_e = 0,15 \text{ \%}(v/v)$, produzindo uma redução de 98% da limpidez, quando comparado com valor da limpidez do suco de maracujá *in natura* (1,81).



Figura 49 - Aplicação do extrato enzimático bruto no suco de maracujá: suco *in natura*, suco após tempo de contato com a enzima e suco filtrado (da esquerda para a direita)

Segundo o gráfico de Pareto (Figura 50), a variável que mais influenciou a limpidez do processo de clarificação do suco de maracujá foi a temperatura (T).

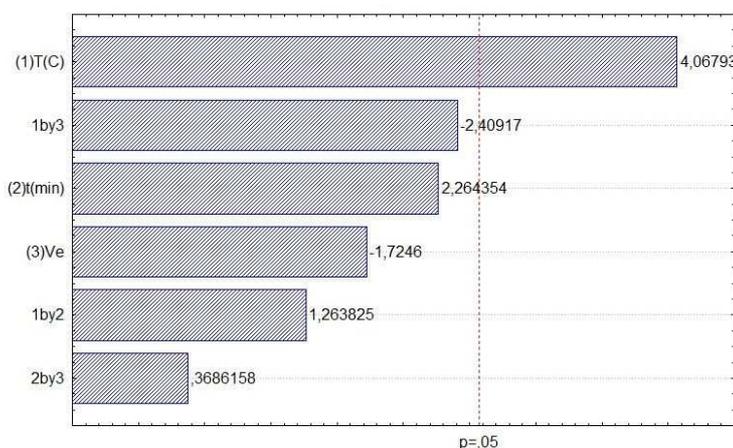


Figura 50 - Gráfico de Pareto para limpidez do suco de maracujá

Abdullah et al. (2007), que estudaram o efeito de enzimas comerciais sobre parâmetros de clarificação e viscosidade do suco de carambola, observaram que a variável com maior influência sobre o processo foi o volume de enzimas aplicado, diferente dos resultados apresentados neste trabalho. No trabalho de Abdullah et al. (2007), a atividade enzimática aplicada nas amostras variou entre 2,6-26U, seguindo os volumes aplicados segundo o planejamento utilizado. Neste trabalho, as atividades enzimáticas variaram entre 0,134-0,402U. Devido os valores de atividade enzimática

serem bem menores, não foi possível observar a influência do fator volume de enzimas no planejamento aplicado, sobressaindo-se então a temperatura de hidrólise.

O complexo enzimático produzido por fermentação semissólida, utilizando bagaço do pedúnculo de caju como substrato e *Aspergillus niger*, produziu efeito nos parâmetros limpidez e quantidade de pectina, o que demonstra efeito direto na clarificação e redução da viscosidade, por consequência, sem alterar a acidez total e o pH do suco processado. Tal consideração também foi reportada por Lima (2006), que utilizou-se de extrato enzimático bruto a partir de fermentação semissólida, na clarificação de sucos de fruta de camu-camu.

CONCLUSÕES

Para o processo de fermentação semissólida, para produção de poligalacturonases, usando bagaço seco do pedúnculo de caju, em escala bancada:

- A maior atividade poligalacturonásica (33,27U/g) foi encontrada com 50 % (b.u) de umidade inicial, 10^6 esporos por grama de meio úmido, 1,5 % (m/m) de sulfato de amônio e 35°C às 29 horas de fermentação;
- Os modelos para as 21, 29 e 54 horas de fermentação foram considerados estatisticamente significativos com 95% de confiança;
- Observou-se que a umidade possui maior influência no processo, tendo influência positiva em todos os tempos de fermentação.

Para as fermentações semissólidas realizadas em reator bandeja, observou-se que:

- A maior atividade poligalacturonásica observada (15,72 U/g) foi obtida com 40 mm de espessura da camada de meio e temperatura de 23°C, às 69 horas de fermentação;
- Os modelos para as 45 e 69 horas de fermentação foram estatisticamente significativo para 95% de confiança;
- A temperatura é a variável que mais influencia o processo.

Para a caracterização da estabilidade enzimática:

- A temperatura ótima de estabilidade da enzima foi 40°C. O pH ótimo encontra-se entre 2,5 e 3,5. Com até 30 minutos de exposição a temperatura e pH ótimos, a enzima se manteve com 90% de sua atividade.

Para a extração enzimática com água:

- A maior atividade poligalacturonásica 6,89 U/g foi obtida sob as condições de tempo igual a 15 min, rotação do shaker igual a 45 rpm e razão de solvente/massa de meio fermentado igual a 15 mL/g, caracterizando 35% a mais de recuperação;
- Os fatores que mais influenciaram o processo foram o tempo de contato e a rotação do shaker.

Para a aplicação do extrato bruto no suco de maracujá:

- As características do suco *in natura* variam com relação ao reportado na literatura, pois dependem da época da colheita do fruto, fenômenos e práticas agrícolas, etc.

- Quanto a verificação da influência dos fatores sobre o processo de aplicação enzimática no suco, sob as condições de temperatura igual a 50°C, tempo de contato de 20 min e volume de enzima igual a 0,05 %(v/v), ocorreu a maior redução da quantidade de pectina, cerca de 95%;
- Não houve variação na acidez total e pH do suco após a hidrólise enzimática;
- Apenas o modelo empírico para a limpidez foi significativo com 95% de confiança, tendo a temperatura de hidrólise como fator que mais influenciou o processo;
- O menor valor de absorvância para a limpidez 0,04 foi alcançado sob as condições: temperatura de 30°C, tempo de contato de 20 min e volume de enzima igual a 0,15 %(v/v), correspondendo a uma redução de 98% da limpidez do suco *in natura*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H.; SHAFIGHZADEH, H.; RAHIMI, A. Continuous production of polygalaturonases (PGases) by *Aspergillus awamori* using wheat flour in surface culture fermentation. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 50-55, 2011.

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

ALCÂNTARA, S.R. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço do pedúnculo do caju: influência da atividade de água e fonte de nitrogênio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), UFCG, Campina Grande, 2008.

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

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

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

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

AL-NAJADA, A. R.; HINDI, R. R.; MOHAMED, S. A. Characterization of polygalacturonases from fruit spoilage *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus tubingensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 8527-8536, 2012.

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

BARI, M. R.; ALIZADEH, M.; FARBEH, F. Optimizing endopectinases production from date pomace by *Aspergillus niger* PC5 response surface methodology. **Food and Bioprocess Processing**, v. 88, p. 67-72, 2010.

BARROS, S. T. D.; DOCÊ, R. C.; JÚNIOR, R. H. S.; RAMOS, A. C. H.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, R. A. Clarificação do suco de maracujá por microfiltração. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.

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

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T., SOUSA, P. H. M. Análises físico-químicas e sensoriais de pedúnculo de caju submetido à desidratação osmótico-solar. **Revista de Ciência Agronômica**, v. 34, p.139-145, 2003.

BRASIL. Decreto nº 2.314 de 4 de setembro de 1997.

BRASIL. Decreto nº 6.871 de 4 de junho de 2009.

BRASIL. Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

CAMPOS, A. R. N.; SANTANA, R. A. C.; DANTAS, J. P.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, n. 2, 2005.

CARVALHO, G. G. P.; FERNANDES, F. E. P.; PIRES, A. J. V. Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. VII, n. 1, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010106.html>, 2006.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.

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

CIANI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v.25, p. 579-583, 2005.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFRN, Natal, 2004.

COURI, F. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 33T5B8.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

COUTO, S. R.; MOLDES, D.; LIÉBANAS, A.; SANROMÁN, A. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 21-26, 2003.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, p. 291-302, 2006.

DALSENTER, F. D. H.; VICCINI, G.; BARGA, M. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40. P. 801-807, 2005.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., vol. 2, 2001.

DOMINGUES, R. C. C.; FARIA JÚNIOR, S. B.; SILVA, R. B.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Clarification of passion fruit juice with chitosan: effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 467-471, 2012.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 223-227, 2003.

FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial.** Tese (Doutorado em Processos Biológicos), UFPR, Curitiba, 2009.

FERREIRA, M. A. J.; DUARTE, O. R. O Caju gerando emprego e renda. **Página Rural.** Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/artigo/728/o-caju-gerando-emprego-e-renda.2003>.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), Recife, 2005.

GUEDES, R. C.; RIBEIRO, J. A. B.; SILVA, N. M. P.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Cellulolytic enzymes production by submerged culture using pre-treated lignocellulosic agr-industrial residues as substrate. In: Anais do 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemical, Clearwater beach (FL), 2010.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova.** v. 30, p. 136-145, 2007.

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

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

HESELTIME, C. W. Solid state fermentation. **Biotechnology Bioengineering.** v. 14, p. 517-532, 1972.

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

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

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

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. Métodos ou diagnósticos foliar utilizados nas plantações do grupo booken na Guiana Inglesa: amostra geral e técnica de análises. **Fertilité**, n. 21, p. 3-11, 1964.

LIMA, A. R. S. **Produção de pectinases *Aspergillus* e clarificação de suco de camu-camu com poligalacturonase e pectinesterases**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), UFAM, Manaus, 2006.

LINDSAY, R. C. Aditivos alimentares. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. **Sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Edições UFC, 2007.

MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido**. Tese (doutorado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1990.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. Dissertação (Mestrado em Ciências), USP, Ribeirão Preto, 2008.

MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. **Enzyme Research**. v. 2011, p. 1-6, 2011.

MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), UNESP, Rio Claro, 2006.

MATIAS, M. F.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A. Use of fibers obtained from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 143-150, 2005.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; SOUQUET, J.; FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 112, p. 851-857, 2009.

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

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New development in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MOURA, R. S. F. **Estudo da cinética de secagem de caju (*Anacardium occidentale L.*) em um secador de leito fixo**. Dissertação (mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, 2001.

MOURA, R. S. F.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SOUSA, A. G.; SILVA, M. M.; OLIVEIRA, A. M. V. Modelagem matemática para isotermas em polpa de caju. **Revista de Biologia de Ciências da Terra**. v. 4, p. 32-40, 2004.

OLIVEIRA, L. G. L.; IPIRANGA, A. S. R. Sustentabilidade e inovação na cadeia produtiva do caju no Ceará. **Revista Eletrônica de Gestão Organizacional**, v. 7, p. 252-272, 2009.

OLIVEIRA, R. C.; DOCÊ, R. C.; DE BARROS, S. T. D. Clarification of passion fruit juice by microfiltration: analyses of operating parameters, study of membrane fouling and juice quality. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 432-439, 2012.

PADMA, P. N.; ANURADHA, K.; KUMAR, V. S.; REDDY, G. Use of pectin rich fruit wastes for poligalacturonase production by *Aspergillus awamori* MTCC 9166 in solid state fermentation. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 2, p. 1-3, 2012.

PANDEY, A. **Concise encyclopedia of bioresource technology**. New York: Food Products Press, 2004.

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

PAULA, B.; MORAIS, I. V. M.; CASTILHO, C. C.; GOMES, F. S.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Melhoria na eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação dos processos de microfiltração e enzimático. **Boletim do CEPPA**, v. 22, p. 311-324, 2004.

PEDROLI, D. B. **Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de *Aspergillus giganteus***. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas), UNESP, Rio Claro, 2008.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, p. 98-103, 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**. v. 74, p. 17-20, 2006.

RAIMBAULT, M.; DESCHAMPS, A.; MEYER, F.; SENEZ, J. C. Direct protein enrichment of starchy products by fungal solid fermentation. In: Proc. Giam-V, Marseilles, 1977.

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

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1979.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, S. M. B.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, p. 635-641, 2010.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFU, Uberlândia, 2010.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Estudo do pré-tratamento de bagaço de caju para a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae*. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, 2008.

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

SANTIAGO, A. M.; ANJOS, D. A.; ALCÂNTARA, S. R.; OLIVEIRA, L. S. C. Aproveitamento da casca do umbu seca na produção de pectinases por *Aspergillus niger* em cultivo semi-sólido. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, 2011.

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

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFRN, Natal, 2007.

SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, p. 1973-1978, 2008.

SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Síntese de poligalacturonase por *Aspergillus niger* CCT0916 por fermentação semi-sólida do pedúnculo de caju. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Santos-SP, 2006.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SILVA, D.; RIZZATTO, M. L.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Utilização de resíduos agro-industriais para produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), Recife, 2005.

SOUSA, C. A. B. **Recuperação de poligalacturonases produzidas pela fermentação semi-sólida do resíduo agrícola do maracujá amarelo empregando sistema aquoso bifásico.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFCG, Campina Grande, 2010.

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

SOUZA, R. L. A. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato.** Dissertação (mestrado em Engenharia Química), UFCG, Campina Grande, 2008.

SOUZA, R. L. A.; AMORIM, B. C.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), Curitiba-PR, 2007.

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

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities

production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 25, p. 411-419, 1999.

TARI, C.; GOGUS, N.; TOKATLI, F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus soave* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1108-1116, 2007.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E. da; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**. v.29, p.489-492, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia**. Vol. 2. São Paulo: Editora Blücher, 2010.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 323-329, 2000.

ANEXOS

Publicações referentes à tese

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, F. L. H. Avaliação da temperatura em um processo de fermentação semi-sólida para produção de poligalacturonases. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, 2010.

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

ALCÂNTARA, S. R.; SANTIAGO, A. M.; SILVA, F. L. H. Comportamento cinético da umidade, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica em um processo de fermentação semi-sólida. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, 2011.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, F. L. H. Solid state fermentation process for polygalacturonase production using tray bioreactor. **Chemical Engineering Transactions**. v. 27, p. 355-360, 2012.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, N. J. L. G. F.; SILVA, F. L. H. Some properties behavior in a solid state fermentation process using tray bioreactor. In: 4th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorization (WasteEng), Porto, 2012.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, J. S. A.; SILVA, F. L. H. Fermented mass variation in solid state fermentation process for polygalacturonase production. In: 4th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorization (WasteEng), Porto, 2012.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, F. L. H. Umidade, pH, açúcares redutores e atividade poligalacturonásica em um processo de fermentação semi-sólida usando reator bandeja. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (Cobeq), Búzios, 2012.

LEITE, N. J.; ALCÂNTARA, S. R.; LIMA, F. C. S.; SILVA, F. L. H. Estudo da estabilidade da enzima poligalacturonase frente ao pH e a temperatura. In: Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos, João Pessoa, 2012.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, N. J. L. G. F.; SILVA, F. L. H. Scale up of polygalacturonase production by solid state fermentation process. In: Muzzalupo, I. **Food Industry**. 1.ed. Rijeka: InTech, 2013, p. 399 -420.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, N. J. L. G. F.; SILVA, F. L. H. Tratamento do suco de maracujá amarelo com extrato bruto obtido por fermentação semissólida. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz do Iguaçu, 2013.

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, F. L. H. Extração com água de poligalacturonases obtidas por fermentação semissólida. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz do Iguaçu, 2013.