

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS
PECTINOLÍTICAS PELO AGENTE
BIOLÓGICO “G088”**

LÍVIA MARTINEZ ABREU SOARES COSTA

2007

LÍVIA MARTINEZ ABREU SOARES COSTA

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS
PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Química dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Costa, Livia Martinez Abreu Soares

Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de
enzimas pectinolíticas pelo agente biológico "G088"/ Livia Martinez Abreu Soares
Costa. -- Lavras : UFLA, 2007.

86 p. : il.

Orientador: Carlos José Pimenta.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Resíduo agroindustrial. 2. Substrato. 3. Enzimas. 4. Pectinase. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-628.746

LÍVIA MARTINEZ ABREU SOARES COSTA

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS
PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Química dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2007

Profa. Dra. Sara Maria Chalfoun

UFLA

Profa. Dra. Maria Emília de S. Gomes Pimenta

UFLA

Prof. Dr. Carlos José Pimenta
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

OFEREÇO

*Aos meus pais, Luiz Alberto e Maria da Boa Morte, a vó Luzia, a tia Dorinha e a tia Ângela, pela confiança, carinho e preocupação.
Aos meus irmãos, **Stella, Rinaldi, Lillian**, Louizi, Armando e Joelma pela compreensão, apoio e força nas horas mais difíceis dessa caminhada.
A todos os meus familiares, pelo incentivo, carinho e amor.
A parrudinha, pelas horas de companhia ao longo das intermináveis jornadas de trabalho.*

DEDICO

**A “todos” que de alguma forma, me deram apoio e me ajudaram a crescer,
a lutar e a chegar a mais uma conquista, entre as várias que a vida nos impõe.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e a vida e por todas as suas bênçãos.

A Nossa Senhora de Fátima por iluminar e proteger minha vida.

Ao professor Carlos José Pimenta, pela orientação, credibilidade, amizade, liberdade e confiança durante o mestrado.

A professora Sara Maria Chalfoun pelo apoio, orientação, amizade e crescimento profissional.

A Dra. Maria Emília de S. Gomes Pimenta por toda ajuda e atenção.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela formação acadêmica e apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos “amigos” e familiares, em especial a Sabrina, pelo grande auxílio e dedicação durante a condução do experimento e pela valiosa amizade, que contribuíram para a realização deste trabalho. Especialmente aos “amigos” para os quais qualquer hora é hora, seja no trabalho ou na descontração. E aos amigos distantes, porém, amigos.

Aos funcionários das secretarias de pós-graduação e de graduação do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela paciência e amizade, e aos funcionários responsáveis pela limpeza (aqueles presentes e aos que por algum motivo não estão mais), pela amizade, preocupação e descontração nas horas vagas.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos do DCA/UFLA, pelo companheirismo e colaboração nas análises químicas e bioquímicas.

Ao pessoal da EPAMIG, pela ajuda, busca de conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

BIOGRAFIA

Lívia Martinez Abreu Soares Costa, filha de Luiz Alberto Soares Costa e Maria da Boa Morte Abreu Soares Costa, nasceu em Lavras, MG.

Em setembro de 1999, ingressou na Universidade Federal de Lavras, onde, em julho de 2004, obteve o título de Engenheira Agrônoma.

Em março de 2005, iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, na Universidade Federal de Lavras, tendo concentrado seus estudos na área de Química dos Alimentos.

Em fevereiro de 2007, submeteu-se à defesa de dissertação para a obtenção do título de “Mestre”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO GERAL	iv
GENERAL ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO	3
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 A Biotecnologia e a Produção de Enzimas	4
2.2 Enzimas.....	5
2.3 Enzimas Pectinolíticas	6
2.3.1 Pectina metil esterase (PME).....	9
2.3.2 Poligalacturonase (PG)	11
2.3.3 Exo-poligalacturonase	12
2.4 Aplicações Industriais de Pectinases	13
2.4.1 Importância das enzimas pectinolíticas no processamento de sucos, frutas e vegetais.	13
2.5 Preparações Comerciais de pectinases.....	16
2.6 Microrganismos e a produção de enzimas	18
2.7 Microrganismos e substrato sólido	22
2.8 O setor agroindustrial e os subprodutos agroindustriais	23
2.9 Substratos utilizados na produção de enzimas por microrganismos.....	24
2.9.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar.....	25
2.9.2 Casca de Maracujá.....	25
2.9.3 Bagaço de Laranja	26

2.9.4 Bagaço de Uva	26
2.9.5 Grãos quebrados de Arroz	27
2.9.6 Casca de café	28
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO II: UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”	
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Instalação do experimento	42
2.2 Agente biológico “G088”	43
2.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	43
2.4 Metodologia analítica	44
2.4.1 Pectinametilesterase.....	44
2.4.1.1 Obtenção do extrato enzimático da pectinametilesterase	44
2.4.1.2 Atividade da pectinametilesterase.....	44
2.4.2 Poligalacturonase	45
2.4.2.1 Obtenção do extrato enzimático da poligalacturonase.....	45
2.4.2.2 Atividade da poligalacturonase.....	45
2.4.3 Pectinas total e solúvel.....	46
2.4.4 pH	46
2.4.5 Acidez titulável (AT)	46
2.4.6 Umidade.....	46
2.4.7 Extrato etéreo.....	46

2.4.8 Proteína bruta.....	46
2.4.9 Fibra.....	47
2.4.10 Fração cinza.....	47
2.4.11 Açúcares solúveis totais.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 Açúcar total e Composição Centesimal dos substratos antes da inoculação do agente biológico “G088”.....	48
3.2 Enzimas pectinolíticas.....	50
3.2.1 Atividade enzimática dos substratos antes da inoculação do agente biológico “G088”.....	50
3.2.2 Atividade da poligalacturonase (PG).....	51
3.2.3 Atividade da pectina metil esterase (PME).....	54
3.3 Substâncias pécticas.....	58
3.3.1 Pectina solúvel.....	58
3.3.2 Pectina Total.....	61
3.3.3 Solubilidade da pectina.....	64
3.4 Condições de cultivo dos substratos.....	67
3.4.1 pH.....	67
3.4.2 Umidade.....	71
3.4.3 Acidez titulável (AT).....	74
4 CONCLUSÕES.....	78
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	83

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Preparações comerciais de Pectinases.....	16
TABELA 2	Valores médios de açúcar, em g/100g, umidade e extrato etéreo, em porcentagem, em função dos substratos estudados.....	48
TABELA 3	Valores médios de fração protéica, fibra bruta e cinzas, em porcentagem, em função dos substratos estudados....	49
TABELA 4	Valores médios das atividades de PG e PME (U/min/g de amostra) sem inoculo.....	50
TABELA 5	Valores médios de atividade PG (U/min/g de amostra), em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	51
TABELA 6	Valores médios originais de atividade PME em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	55
TABELA 7	Valores médios de pectina solúvel, em mg/100g, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	59
TABELA 8	Valores médios de pectina total, em mg/100g, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	62
TABELA 9	Valores médios de solubilidade de pectina, em porcentagem, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	65
TABELA 10	Valores médios de pH em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	68

TABELA 11	Valores médios de umidade, em porcentagem, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	72
TABELA 12	Valores médios de acidez titulável, em ml de NaOH, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico.....	75

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Estrutura química da cadeia de pectina.....	07
FIGURA 2	Reações de atuação da PME sobre a Pectina.....	10
FIGURA 3	Atuação da PE e PG sobre a pectina metilada produzindo o ácido D-galacturônico.....	11
FIGURA 4	Reações químicas que demonstram o mecanismo de atuação da PG.....	12
FIGURA 5	Valores médios de atividade PG, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.....	52
FIGURA 6	Valores médios de atividade PME, transformados por $\log_{10}(y+1)$, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.....	56
FIGURA 7	Valores médios de pectina solúvel, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.....	60
FIGURA 8	Valores médios de pectina total, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.....	63
FIGURA 9	Valores médios de solubilidade de pectina, para cada um dos substratos, em função dos tempos de cultivo do agente biológico.....	66
FIGURA 10	Valores médios de pH, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.....	69
FIGURA 11	Valores médios de umidade, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.....	73
FIGURA 12	Valores médios de acidez, para o substrato uva, em função dos tempos de cultivo do agente biológico.....	76

RESUMO GERAL

COSTA, Livia Martinez Abreu Soares. **Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico “G088”**. 2007. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Recentemente, um grande número de microrganismos, isolado de diferentes materiais tem sido selecionado, por sua habilidade de degradar os polissacarídeos presentes em biomassa vegetal produzindo pectinases (enzimas pectinolíticas) em substratos sólidos. Vários resíduos agro-industriais e subprodutos tais como, bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, casca de café e outros resíduos de processamento de alimentos são substratos eficazes para a produção de enzimas pectinolíticas. A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar substratos alternativos e solucionar problemas de poluição para as indústrias e de custo na produção de enzimas. As enzimas pectinolíticas, que degradam a pectina presente na lamela média e parede celular primária, têm grande importância comercial para diversas aplicações industriais, como melhorar os rendimentos de suco e clarificação na indústria de alimentos, cervejaria e indústria farmacêutica e têxtil. Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial de produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico “G088” em resíduos vegetais utilizados como substratos. A primeira etapa foi inocular o agente biológico nos diferentes substratos: bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar, casca de uva, casca de maracujá, casca de café e arroz. As atividades enzimáticas de poligalacturonase (PG) e pectina metil esterase (PME) dos substratos foram avaliadas, o melhor resultado para cada enzima foi em função do tempo de cultivo e do tipo de substrato. Foram feitas análises de quantificação de pectina, pH, umidade e acidez titulável dos substratos com inóculo e da composição centesimal dos substratos sem inóculo. Os diferentes substratos apresentaram atividade das pectinases, poligalacturonase (PG) e pectina metil esterase (PME), com destaque para a casca de uva e arroz. Porém o melhor substrato para produção de PG (117,35 U/g) e PME (1760 U/g) aos 14 dias foi à casca de uva. A composição do substrato tem influência direta na produção de PG e PME.

* Comitê de Orientação: Carlos José Pimenta - UFLA (Orientador); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-orientadores).

GENERAL ABSTRACT

COSTA, Livia Martinez Abreu Soares. **Utilization of agroindustrial residues as substrates for production of pectinolytic enzymes by biological agent “G088”**. 2007. 86p. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Recently, a great number of microorganisms, isolated from different materials have been screened, for their capabilities of degrading the polysaccharides present in the plant biomass producing pectinases (pectinolytic enzymes) in solid substrates. A number of agroindustrial residues and by-products such as orange bagasse, sugar cane bagasse, wheat meal, coffee hull and other food processing residues are effective substrates for the production of pectinolytic enzymes. The application of residues is a way to utilize alternative substrates and solving pollution problems for the industries and of cost in enzyme production. Pectinolytic enzymes, which degrade the pectin present in the medium lamella and primary cell wall, have a great commercial importance for several industrial applications, such as to improve the juice yields and clarification in the industry of food, beer-making and pharmaceutical and textile industry. It was intended with this work to evaluate the potential of producing pectinolytic enzymes by biologic agent “G088” in plant residues utilized as substrates. The first step was inoculating the biologic agent in the different substrates: orange bagasse, sugar cane bagasse, grape skin, passion fruit skin, coffee and rice hull. The enzymatic activities of polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME) of the substrates were evaluated; the best result for each enzyme was related with cropping time and type of substrate. Analyses of pectin quantification, pH, moisture and titrable acidity of the substrates with inoculum and of the centesimal composition of the substrates without any inoculum were done. The different substrates showed activity of the pectinases, polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME), standing out grape skin and rice hull. But, the best substrate for production of PG (117.35 U/g) and PME (1760 U/g) at 14 days was grape skin. The composition of the substrate has a direct influence on the production of both PG and PME.

* Guidance Committee: Carlos José Pimenta - UFLA (Adviser); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-advisers).

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde os tempos remotos a humanidade se beneficiou das enzimas na fabricação de pão, cerveja e vinhos. De um modo geral as enzimas são muito utilizadas nos mais diversos processos industriais, isso é devido ao seu potencial catalítico e sua especificidade. Contudo, uma enzima tem valor comercial só quando houver uma demanda ou tiver propriedades que atendam os requerimentos técnicos e econômicos do processo industrial.

Atualmente, a utilização de enzimas pectinolíticas tem aumentado progressivamente, pois apesar de apresentarem relevante papel na degradação e apodrecimento de frutas e vegetais, elas têm consideráveis aplicações como na indústria têxtil, química, cosmética e farmacêutica, com destacado papel no setor alimentício, pois podem influir na composição e processamento. No processamento de sucos, a adição controlada de enzimas reduz a viscosidade, facilitando a clarificação e melhorando a concentração, a filtração e a estabilização dos componentes. Os conhecimentos sobre a estrutura da parede celular permitem procedimentos com enzimas a fim de degradar substâncias específicas presentes na parede em função do objetivo a ser alcançado: extração, clarificação ou concentração de sucos.

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria para produção de enzimas pectinolíticas. O tipo de fungo é muito importante para o sucesso na obtenção de enzimas, tradicionalmente se utiliza fungo do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* para tal finalidade, necessitando de estudos de novos agentes, uma vez que os tradicionais podem apresentar espécies produtoras de metabólitos tóxicos.

Visando minimizar vários problemas das mais diversas ordens, recentemente iniciou uma tendência crescente de utilização de resíduos

industriais na produção de enzimas, associando os vários desperdícios agroindustriais e seus subprodutos, utilizando-os como substratos no desenvolvimento e crescimento de microrganismos, para produção das enzimas pectinolíticas aprofundando assim a utilização de recursos produtivos potencialmente aproveitáveis que são tratados como resíduos numa nítida indicação de desperdício.

O substrato tem uma grande influência nos resultados do processo de produção de enzimas. Em geral as pectinases são enzimas pectinolíticas induzidas, e por causa disto é indicado à utilização de substratos ricos em pectina como bagaço de laranja, bagaço de beterraba, maçãs, bagaço de cana-de-açúcar ou frutas cítricas. Uma escolha apropriada do substrato pode levar a uma melhor produção enzimática pelo agente biológico. O Brasil é um país agrícola cujas potencialidades não dependem somente da reutilização de resíduos agroindustriais, mas também de técnicas e tecnologias apropriadas para produção de enzimas.

Em função do grande número de formulações enzimáticas disponíveis e da diversidade de frutas utilizadas no processamento de alimentos, há necessidade de conhecimento das particularidades dos substratos e das enzimas a fim de se obter bons resultados nestes processamentos. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar o potencial de produção de enzimas pectinolíticas por um novo agente biológico isolado “G088” a partir de substratos a base de resíduos gerados na agroindústria.

CAPÍTULO I
REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Biotecnologia e a Produção de Enzimas

Até meados da década de 70, a biotecnologia tinha como principal objetivo desenvolver sistemas de produção de biomoléculas de interesse comercial, geradas pelo metabolismo de microorganismos. Classicamente, a biotecnologia era definida como uma atividade de aplicação de princípios científicos e de engenharia no processamento de materiais por agentes biológicos com o objetivo de produzir bens e serviços. Neste sentido, pode-se dizer que o início da biotecnologia clássica remonta ao tempo em que produtos, tais como o vinho, a cerveja, o iogurte e o pão foram obtidos pela primeira vez (Said & Pietro, 2004).

A biotecnologia vem paulatinamente avançando em vários ramos da atividade industrial, por representar uma forma segura e econômica de produção. Têm sido igualmente considerada, em anos recentes, como uma das opções mais atrativas e de maior potencial na solução dos problemas de alimentação, saúde, energia e contaminações ambientais, cujas complexidades e magnitudes crescem dia a dia. Além disso, as condições brandas de processo envolvendo métodos biotecnológicos, implicam geralmente em danos mínimos ao meio ambiente e condição quase isenta de subprodutos indesejáveis. Entre os processos biotecnológicos, aqueles que utilizam enzimas estão entre os de maior importância. As possibilidades de aplicação são infindáveis, desde a recuperação de petróleo até em áreas como viagens espaciais, passando pelas indústrias químicas, de alimentos, farmacêutica, entre outras. Atualmente, o uso de enzimas na produção de cerveja, vinho, pão, queijos, produtos cárneos, têxteis, couro e papel, assim como em detergentes biodegradáveis é comum em todo o mundo (Said & Pietro, 2004).

2.2 Enzimas

As enzimas são proteínas vitais que catalisam reações bioquímicas com grande especificidade, sendo capazes de aumentar em até 10^{14} vezes algumas reações, sem requerer condições extremas de pH, pressão e temperatura. Além de formarem a base do sistema metabólico dos organismos vivos, essas proteínas proporcionam enormes oportunidades às indústrias por efetuarem conversões biocatalíticas finas, eficientes e mais econômicas (Godfrey et al., 1996).

Apesar das enzimas ocorrerem amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam as melhores fontes devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (Altamirano et al., 2000). Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (Jayani et al., 2005). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica, as quais são utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil (amilase, celulase, pectinase), papel (lipase, xilanase, oxidoreductase), detergente (celulase, lipase, protease), couro (lipase, protease) e de alimento (pectinase, lipase, amilase, protease) (Kirk et al., 2002; Van Beilen, 2002), entre outras.

As enzimas microbianas extracelulares podem ser produzidas em meio líquido ou sólido. O uso de meio sólido, ao contrário do meio líquido, permite a triagem de uma grande quantidade de microrganismos (Sanomiya & Nahas, 2003), além de possibilitar uma rápida detecção de enzimas específicas (Sanomiya & Nahas, 2003; Stamford et al., 1998; Strauss et al., 2001). A melhor diferenciação quimiotaxonômica de muitos isolados microbianos é um outro aspecto vantajoso do meio sólido em relação do meio líquido (Hankin & Anagnostakis, 1975).

O uso de enzimas em processos de tecnologia de alimentos é vantajoso porque, dentre outras razões, elas são específicas, não necessitam de temperaturas elevadas para a reação e não formam produtos indesejáveis. A degradação dos principais polímeros constituintes da parede das células vegetais envolve a participação de enzimas (Said & Pietro, 2004).

2.3 Enzimas Pectinolíticas

Pectina, uma palavra de origem grega que significa coagulado, é um termo genérico designado para um grupo de polissacarídeos de estrutura coloidal complexa, localizados na parede celular primária e na lamela média de plantas superiores (Kashyap et al., 2001; Rolin et al., 1998; Strasser & Amadò, 2001).

A célula dos tecidos vegetal está circundada por paredes celulares, as quais são fisicamente rígidas, fornecendo suporte mecânico aos diferentes tecidos. Nas plantas superiores, a parede celular é composta por três camadas denominadas: lamela média, parede celular e parede secundária. A composição química e estrutura física da parede celular variam amplamente entre espécies, cultivares e até entre células adjacentes. Os componentes mais importantes da parede celular são os polissacarídeos: celulose, hemicelulose e as substâncias pecticas, embora proteínas, lignina, água, cutina e suberina, assim como compostos inorgânicos, possam também estar presentes (Goodwin & Mercer, 1982). As substâncias pecticas atuam como matérias cimentantes localizadas na lamela média, derivam dos ácidos poligalacturônicos e ocorrem nas formas de protopectina, ácido pectínico e ácido pético (Salunkhe et al., 1991).

As pectinas são polissacarídeos ácidos que apresentam uma cadeia principal composta de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações do tipo α -1,4 e que, dependendo de sua origem e método de extração, possuem ramificações de resíduos de ramnose, arabinose, galactose e xilose (Kashyap et al., 2001). Estruturalmente, as moléculas de pectina são constituídas de unidades

repetidas de (1→4)- α -D-ácido galacturônico, sendo que parte destas unidades apresenta-se esterificada, como éster metílico (Figura 1) (Hourdet & Muller, 1991). Podemos classificar as substâncias pécnicas em protopectina, ácido pécnico, ácido pectínico e pectina por meio da esterificação parcial dos grupos carboxilas dos ácidos galacturônicos com metanol e neutralização com íons sódico, potássio ou amônio (Kashyap et al., 2001; Rolin et al., 1998).

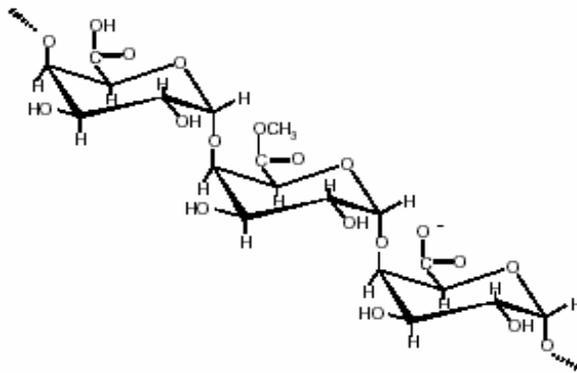


FIGURA 1. Estrutura química da cadeia de pectina (Hourdet & Muller, 1991).

Apesar de a pectina conter outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas usualmente se refere àquelas enzimas que catalisam a degradação das moléculas constituídas por unidades de ácidos galacturônicos. As pectinases são classificadas em desmetoxilantes e despolimerizantes (Pilnik & Rombouts, 1981), de acordo com seus mecanismos de ação.

As pectinases desempenham importante papel no crescimento da planta, amadurecimento do fruto e na modificação da biomassa (Beldman et al., 1984; Linko et al., 1989; Walsh & Headon, 1994). Essas enzimas são produzidas por várias espécies de plantas e microrganismos, destacando-se as espécies dos

gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (Blanco et al., 1994). As enzimas são classificadas de acordo com o modo de ação (hidrólise ou trans-eliminação) e preferência pelo substrato (pectina, ácido pécico ou oligo-D-galacturonato) (Blanco et al., 1994; Kashyap et al., 2001; Pilnik & Voragen, 1993). Combinações de pectinases com outras enzimas (celulases, hemicelulases e lignases) atuam sinergicamente na degradação da parede celular das plantas (Beldman et al., 1984).

As pectinases ainda podem ser classificadas em ácidas ou alcalinas (Kashyap et al., 2001). As pectinases ácidas são utilizadas principalmente no processamento de sucos e frutas e vinhos, maceração de tecido de plantas, liquefação e sacarificação de biomassa e isolamento de protoplastos, enquanto que as pertencentes ao grupo às alcalinas são aplicadas na indústria têxtil, no branqueamento de polpa de papel, extração de óleo vegetal e fermentação de café e chá.

As pectinases ácidas são na sua maioria isoladas de extratos brutos de fungos, com destaque para *Aspergillus niger* e algumas espécies do gênero *Trichoderma*. Basicamente, essas enzimas são utilizadas nas indústrias de sucos de frutas e de vinhos (Kashyap et al., 2001). O uso industrial dessas enzimas tem por finalidade o aumento no rendimento da extração e clarificação dos sucos durante as etapas de prensagem, decantação e remoção de partículas em suspensão (Rolin et al., 1998). Em frutas verdes, a pectina encontra-se em sua forma insolúvel associada à celulose, contribuindo para uma maior rigidez do fruto. O amadurecimento da fruta é devido a vários fatores, tais como solubilização de pectina por enzimas naturais, amolecimento e compressão do fruto, que facilitam, por sua vez, a extração do suco (Said & Pietro, 2004).

O uso de pectinases alcalinas no branqueamento mecânico de polpa de papel tem como efeito uma redução da demanda catiônica da polpa (Reid & Ricard, 2000). Os polímeros catiônicos são utilizados na indústria de celulose e

papel com finalidade de reter fragmentos de fibras e partículas inorgânicas (argila e CaCO_3) na folha de papel e aumentar a drenagem da água, com a formação de pontes entre as superfícies carregadas negativamente de fragmentos de fibras e partículas. A pectina forma um complexo com o polímero catiônico, contribuindo para um aumento da demanda catiônica. A pectina dissolvida pelo tratamento alcalino da polpa não apresenta uma estrutura metoxilada, dessa forma, um mecanismo de ação enzimática por endoclivagem (atividade da poligalacturonase) é o mais apropriado (Horn & Linhart, 1996). Além da sua utilização em etapas de branqueamento de polpa de celulose, as pectinases alcalinas são também úteis na produção de papel japonês (Said & Pietro, 2004).

Grandes mudanças na estrutura péctica acompanham o amadurecimento de muitos frutos. Essas mudanças na estrutura têm sido atribuídas à ação de poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME) (Seymour et al., 1993). A hidrólise da cadeia de pectina é obtida pela ação sinérgica de algumas enzimas, incluindo pectina metil esterase, endo e exo-poligalacturonase, pectato liase e pectina liase (Soares et al., 2001).

2.3.1 Pectina metil esterase (PME)

A enzima PME é conhecida por desesterificar compostos pécticos constituintes da parede celular das plantas. A hidrólise de grupos metil-éster, catalisada por esta enzima, produz uma pectina com menor grau de metilação, a qual sofre clivagem pela poligalacturonase (PG). Assim, o efeito sinérgico dessas duas enzimas tem um importante papel no processo de amolecimento do fruto durante o estágio de amadurecimento. A desmetilação da pectina resulta em um maior número de grupos carboxílicos, o que pode facilitar a ação da poligalacturonase, que degrada substâncias pécticas, preferivelmente desesterificadas (Fry, 1986).

Vários tipos de enzimas participam da clivagem do polímero de pectina (Linko et al., 1989). A pectina esterase (EC 3.1.1.11), também denominada de pectina metil esterase ou pectina acetilesterase, cliva ligações metilester ou acetilester com formação de ácido pécico. A atividade de pectina metil esterase está presente em plantas superiores, sendo abundante em frutas cítricas e legumes, assim como em microrganismos, principalmente fungos (Whitaker, 1990a; Walsh & Headon, 1994). A pectina metil esterase de origem vegetal hidrolisa ligações éster próximas a resíduos não esterificados. A PME remove os grupos metoxil das pectinas por um ataque nucleofílico da enzima no éster, resulta na formação de um intermediário acil-enzima com a liberação de metanol. Segue-se então, uma deacilação (hidrólise do intermediário) regenerando a enzima e o ácido carboxílico (Figura 2) (Braverman, 1980).

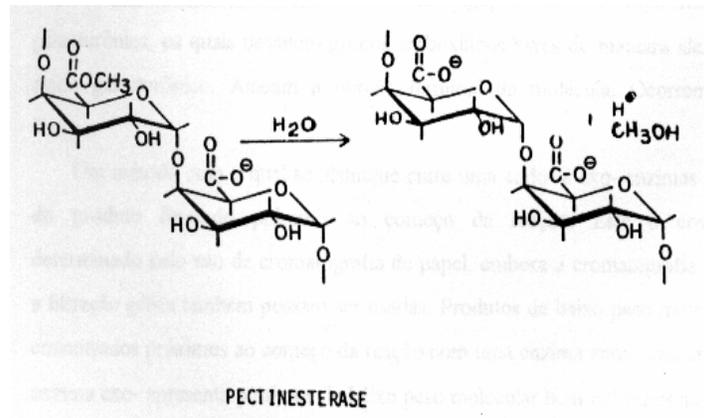


FIGURA 2 – Reações de atuação da PME sobre a Pectina (Braverman, 1980).

2.3.2 Poligalacturonase (PG)

Hidrolisa de forma aleatória as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização de molécula (Pilnik & Rombouts, 1981). A atividade desta enzima tem sido identificada em vários frutos em amadurecimento e está correlacionada com o aumento no teor de pectinas solúvel. Catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4-D-ácido galacturônico. É inativa sobre o polímero totalmente metilado, mas em presença da PME, que é capaz de desmetilar a pectina, rompe todas as ligações da cadeia e produz D-galacturônico livre (Figura 3) (Braverman, 1980).

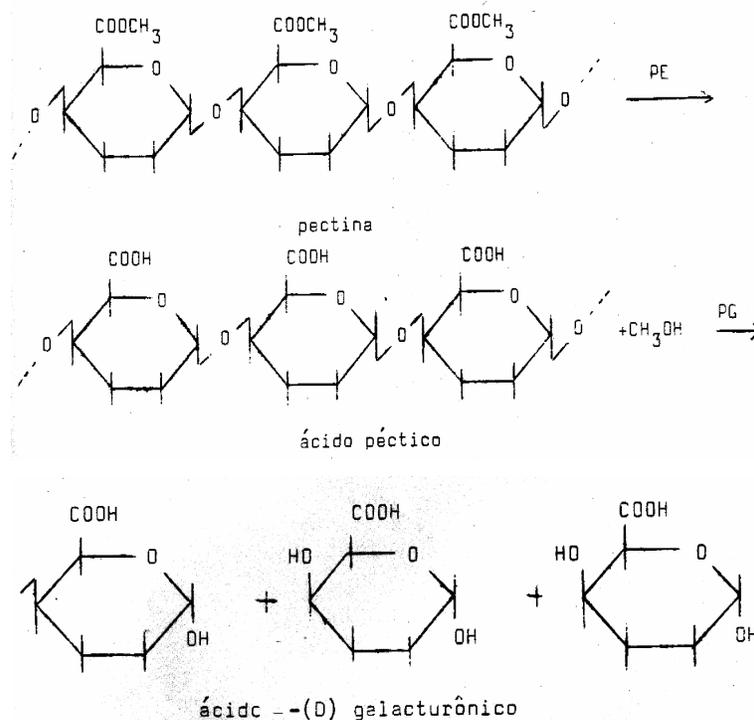


FIGURA 3 – Atuação da PE e PG sobre a pectina metilada produzindo o ácido D-galacturônico (Braverman, 1980).

A PG é a enzima mais importante, principalmente em produtos de caráter ácido, por apresentar uma atividade ótima em pH 4,5 e por ser a mais resistente ao tratamento térmico, no entanto a PG depende essencialmente da ação da PME, que fornece o seu principal substrato, o ácido pécico, a partir da pectina natural da planta (Benen & Vincken, 2002).

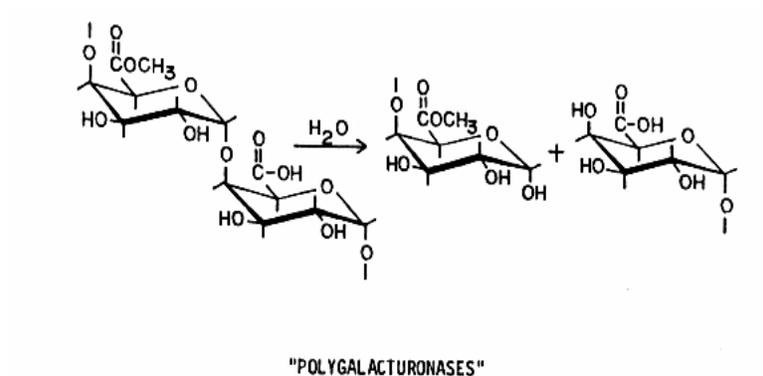


FIGURA 4 – Reações químicas que demonstram o mecanismo de atuação da PG (Braverman, 1980).

2.3.3 Exo-poligalacturonase

Este grupo é subdividido em **Exo-PG-1** (Exo-poly- α -1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.67) que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e **Exo-PG-2** (Exo-poly- α -1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.82) que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (Hennies, 1996; Pilnik & Rombouts, 1981).

2.4 Aplicações Industriais de Pectinases

A demanda mundial por processos otimizados na transformação de biomassa em produtos diversificados e de maior valor agregado, tem resultado no uso de enzimas em diversos processos industriais. As pectinases são um grupo de enzimas utilizadas principalmente na indústria de alimentos (processamentos de frutos e legumes), com um enfoque na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas. Além disso, as pectinases são úteis na extração de óleo vegetal e indústria têxtil e de celulose e papel (Soares et al., 2001). Grande parte dessas enzimas é de origem microbiana (fungos e bactérias) e extracelular.

2.4.1 Importância das enzimas pectinolíticas no processamento de sucos, frutas e vegetais.

O tecido das frutas é formado de células parenquimáticas cuja parede celular e lamela média, são ricas em pectinas e celulose. As pectinas podem constituir até 4% do peso total da fruta (Dekker, 1994). Quando a fruta é moída, a célula se rompe liberando a fase aquosa. Uma fração da pectina, chamada fração solúvel, distribui-se nessa fase aquosa (ou suco) e a outra fração, chamada insolúvel, permanece ligada à parede celular, compondo a polpa. Esta última fração atua como agente espessante na fabricação de geléia, por outro lado dificulta a liberação de líquido, baixando o rendimento na extração de sucos. A aplicação de enzimas nesse processo é fundamental para otimização da extração, rendimento, filtração e estabilidade da cor do produto (Pilnik & Rombouts, 1981; Boyle et al., 1986).

A adição de preparações comerciais de pectinases proporciona um maior rendimento na extração do suco. O processo de extração de sucos de uva, maçã, framboesa, morango e amora são mais eficientes com adição de pectinases produzidas por fungos (Whitaker, 1990a). O suco de maçã pode ser processado

por três procedimentos: como suco turvo obtido através da centrifugação sem uma etapa posterior de filtração; e, por último, como material filtrado e preparado enzimaticamente. Recomenda-se o uso de pectinases que despolimerizem pectinas altamente esterificadas. Uma combinação de celulases e pectinases contribui para um aumento no rendimento do processamento do suco de maçã (Alkorta, 1998). As enzimas pécticas, além de facilitarem a extração do suco de maçã, auxiliam na separação de flocos por sedimentação, filtração ou centrifugação. O tratamento enzimático pode durar de 15 a 120 min, dependendo da quantidade e do tipo de pectinase utilizada, assim como da temperatura e variedade da maçã. A clivagem moderada de pectina solúvel na polpa facilita a extração do suco, pois o acúmulo de partículas de pectina satura o mesmo e bloqueia os canais de drenagem da polpa por onde ele passa (Alkorta, 1998).

A clarificação do suco de fruta envolve as etapas de centrifugação e filtração. Entretanto, ambos procedimentos não são suficientes para remoção completa das partículas que tornam o suco turvo. Nesse caso, uma posterior adição de enzimas pectinolíticas é realizada, tendo como efeito uma diminuição da turbidez do suco devido à clivagem de pectina e à formação de flocos que são retidos, posteriormente, por centrifugação e filtração. Amostras comerciais de pectinases são usadas para clarificar sucos espumantes de frutas (maçã e pêra) (Said & Pietro, 2004).

A clarificação do suco de maçã é influenciada pelo pH, temperatura, tempo de contato e concentração de pectinase. O rendimento de clarificação do suco é melhor em pH ácido. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade de clarificação do suco, desde que esse aumento de temperatura não desnature a pectinase, que tem um melhor desempenho na maioria das vezes a 40°C. Além disso, o tempo requerido para a clarificação do suco é inversamente proporcional à concentração da enzima (Said & Pietro, 2004). A pectinase atua degradando a

pectina e expondo a parte carregada positivamente da proteína. A repulsão eletrostática entre essas partículas é então reduzida, permitindo que elas formem aglomerados que precipitam (Said & Pietro, 2004).

Na indústria de processamento de suco de laranja, a aplicação das pectinases no processo de extração está limitada ao tratamento da polpa (semente e carpelo) gerada pela filtração do suco de primeira, obtido pelo esmagamento da fruta. O suco “pulp wash” é conhecido por ser um suco de segunda classe destinado a indústria de confeitos. A pulp wash é caracterizada como um material altamente viscoso, o que algumas vezes torna difícil a obtenção de bons rendimentos; entretanto, a adição de pectinases reduz a viscosidade e permite um rendimento maior durante a prensagem para extração do suco (Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005).

As pectinases ácidas, especialmente as que apresentam atividade de poligalacturonase, são utilizadas na maceração de frutas e legumes, sendo também denominadas de macerases. A maceração consiste na conversão de tecidos vegetais em uma suspensão de células intactas, que é obtida por hidrólise seletiva da pectina presente na lamela média. A maceração enzimática pode ser usada na produção de néctar de frutos, pudins, iogurtes e alimentos para bebês. Desde que a maceração enzimática do tecido vegetal é um processo que envolve uma clivagem limitada de pectina, uma inativação prévia da atividade de pectina metil esterase endógena é crucial (Kashyap et al., 2001).

As preparações enzimáticas, denominadas comercialmente de “pectinases”, são formuladas para conter um ou mais tipos de enzimas pectinolíticas dependendo do tipo de aplicação, além de atividades de celulases, hemicelulases, proteases e amilases (Peter, 1986), constituindo um “coquetel” enzimático. O microorganismo mais usado para a produção destes preparados é o fungo *Aspergillus niger* (Dekker, 1994; Sims & Bates, 1994). A ação combinada das celulases, pectinases e hemicelulases no tratamento de produtos

vegetais apresenta um efeito sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade final do produto.

2.5 Preparações Comerciais de pectinases

Existem atualmente disponíveis no mercado várias preparações comerciais de pectinases (TABELA I) produzidas por cepas dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*. Os preparados enzimáticos possuem um amplo espectro de atuação na hidrólise de polissacarídeos da parede celular das plantas, com utilização na extração, clarificação, liquefação e maceração de frutas, polpas, legumes e bagaços (Alkorta et al., 1998; Benen & Vincken, 2002; Pilnik & Voragen, 1993; Sakai et al., 1993). Alguns preparados apresentam somente atividade de pectinase, enquanto que outros atuam sinérgicamente com celulases e hemicelulases.

TABELA 1 - Preparações comerciais de pectinases (Said & Pietro, 2004).

Preparação enzimática	Especificação	Função
Bio-cip membrane	Contém atividades de pectinase, celulase, Amilase e hemicelulase e protease	Remoção de colóides de membranas
Citrozym cloudy 1001	Contém atividades de pectinase (endopoligalacturonase, pectinase, pectinase)	Elaboração de extratos de casca e produtos estáveis quanto à turbidez na indústria cítrica
Citrozym ultra 1	Esterase (exopoligalacturonase), hemicelulase e celulase	Redução da viscosidade e clarificação de sucos e limes e limão

“...continua...”

TABELA” 1, Cont.”

Citrozym ceo	Contém atividades de pectinase, hemicelulase e celulase	Aumento dos rendimentos de óleos essenciais cítricos na extração/recuperação
Novo alp-1	Contém atividades de pectinase, hemicelulase Arabanase e celulase	Liquefação de frutas
Novo alp-13	Contém atividades de pectinase	Liquefação e maceração completa de frutas, polpas, bagaços e legumes
Novoferm 50 1	Contém atividades de pectinase, hemicelulase e celulase	Aumenta a filtrabilidade de sucos
Novoclair fce g	Contém atividades de pectinase (ramnogalactu-Ronase)	Clarificação de mostos em vinificação de vinhos branco e rose
Pectinex ar	Contém atividades de pectinase (pectina liase, Poligalacturonase e pectina esterase)	Concentração e Clarificação de suco de maçã
Pectinex be-31	Contém atividades de pectinase e arabanase	Concentração e Clarificação de suco de maçã
Pectinex superpresa	Contém atividades de pectinase	Maceração de frutas
Pectinex ultra sp	Contém atividades de pectinase (pectina Transeliminase, poligalacturonase e pectina Esterase) e hemicelulase	Maceração de frutas
Pectinex 1001	Contém atividades de pectinase	Produção de concentrados de maçã e pêra
Vinoflow g	Contém atividades de pectinase (pectina Transeliminase, poligalacturonase e pectina Esterase), celulase e hemicelulase	Envelhecimento e filtração de vinhos jovens
Vinozym ec	Contém atividades de pectinase e β -glucanase	Maceração de uvas na elaboração de vinho tinto

“...continua...”

TABELA” 1, Cont.”

Vinozym g	Contém atividades de pectinase (pectina liase e Poligalacturonase), hemicelulase e celulase	Maceração de uvas na fabricação de vinho tinto
Vinozym 1	Contém atividades de pectinase (pectina liase e Poligalacturonase), hemicelulase e celulase	Maceração de uvas na fabricação de vinho tinto
Vinozym fce g	Contém atividades de pectinase e celulase	Maceração de uvas na fabricação de vinhos branco e rose
Panzym flux	Contém atividades de pectinase, hemicelulase, Celulase e Arabanase	Filtração de sucos de frutas
Panzym extra	Contém atividades de pectinase, hemicelulase e celulase	Clarificação e filtração de sucos de frutas
Panzym plus	Contém atividades de pectinase, Celulase e arabanase	Clarificação e filtração de sucos de frutas
Panzym mk	Contém atividades de pectinase	Maximiza a produção de sucos de pêra e maçã
Panzym super	Contém atividades de pectinase, celulase e arabanase	Clarificação e filtração de sucos de frutas
Peelzym	Contém atividades de pectinase (Poligalacturonase), hemicelulase e celulase	Produção de frutas descascadas de frutas inteiras, em pedaços e na degradação de membranas.

2.6 Microrganismos e a produção de enzimas

Microrganismos que vivem em condições extremas são, usualmente, uma rica fonte para obtenção de bioprodutos com propriedades diferenciadas, em particular, enzimas. Devido às suas propriedades únicas, esses bioprodutos podem ser empregados em condições ambientais drásticas, que com frequência

ocorrem na prática industrial. O conhecimento do conjunto de enzimas que um microrganismo produz em um determinado substrato, permite avaliar o potencial do preparado enzimático obtido. A presença de um conjunto específico de enzimas pode ser desejável em alguns processos industriais. Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheça, as propriedades da atividade ótima de atuação e a sua estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (Phutela et al., 2005).

Vários insumos alimentares são produzidos por microrganismos. Estes podem ser cultivados em vários tipos de meios de cultura de baixo custo para obtenção do metabólito desejado (Garzón & Hours, 1993).

Os microrganismos capazes de assimilar componentes da biomassa como fonte primária de carbono pertencem a diferentes grupos taxonômicos e são encontrados em ambientes onde existe matéria prima de origem vegetal acumulada e em decomposição (Silveira, 1997). A produção de enzimas pectinolíticas por fungos e bactérias é influenciada por diversos fatores, tais como condições de cultivo, tempo de cultivo, fonte de carbono, pH e temperatura (Bravo et al., 2000).

Muitos microrganismos já foram isolados da natureza e utilizados industrialmente, mas a maioria deles, potencialmente importantes, pode não ter sido ainda devidamente explorados, estima-se que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias tenham sido identificados como produtores de enzimas (Da-Silva et al., 1997). Mesmo que muitas linhagens tenham sido melhoradas geneticamente nos laboratórios, há sempre a possibilidade de que a natureza abrigue uma linhagem com maior potencial na forma selvagem (Bravo et al., 2000).

No caso da seleção de microrganismos celulolíticos, hemicelulolíticos e pectinolíticos, as fontes tradicionais são os alimentos deteriorados, madeiras em decomposição e resíduos agrícolas. A síntese de pectinases, hemicelulases e celulasas são uma propriedade que praticamente todos os microrganismos decompositores de madeiras e fitopatogênicos exibem. Eles diferem no tipo e quantidades de enzimas são produzidas. Assim, existem os microrganismos que secretam uma ou duas das enzimas citadas e, mais raramente, os tipos que secretam todas as enzimas em referência (Phutela et al., 2005).

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria para a produção de celulasas e pectinases (Da-Silva et al., 1997). Os principais microrganismos produtores das enzimas já estudados estão citados a seguir, Pectinolíticos: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Trichoderma Koningii*, *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Geotrichum candidum* (Leuchtenberger & Mayer, 1992). Entretanto, os principais gêneros representantes do grupo dos pectinolíticos são *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma* (Dziezak, 1991; Leuchtenberger & Mayer, 1992), *Penicillium* (Baracat et al., 1989; Baracat-Pereira et al., 1994; Fernandes-Salomão et al., 1996).

Na maioria dos países, que tem regulamentação específica para o uso de enzimas, elas são consideradas aditivas alimentares na indústria alimentícia e seu uso depende de autorização emitida pelos órgãos responsáveis de cada país para este fim (Said & Pietro, 2004). No reino Unido há um comitê vinculado ao Ministério da Agricultura Pesca e Alimentos, o FACC, “Food Additives and Contaminants Committee” que classificou as enzimas em cinco classes considerando o potencial tóxico de metabólitos secundários de microrganismos como toxinas e aflotoxinas (Said & Pietro, 2004):

Grupo A. Substância cuja evidência disponível sugere que são aceitas para uso em alimentos.

Grupo B. Substâncias para as quais a evidência disponível pode ser considerada provisoriamente aceita para uso em alimentos, mas, outras informações devem estar disponíveis dentro de um determinado período de revisão.

Grupo C. Substâncias para as quais a evidência sugere toxicidade e não devem ser permitidas em alimentos até que evidências adequadas de sua segurança sejam estabelecidas para sua aceitabilidade.

Grupo D. Substâncias para as quais a informação disponível indica toxicidade definitiva ou provável e que não deve ser permitida em alimentos.

Grupo E. Substâncias para as quais não há dados toxicológicos disponíveis ou são inadequados e para as quais não é possível expressar uma opinião para sua aceitabilidade em alimentos.

Nos Estados Unidos as enzimas para serem usadas nas indústrias de alimentos devem preencher alguns requisitos que as caracterizam como GRAS “Generally Regarded As Safe”, geralmente consideradas como segura, de acordo com o FDA “Food and Drug Administration”. Os órgãos regulamentares da maioria dos países concordam que enzimas oriundas de plantas ou de tecidos animais comestíveis não precisam passar por testes, desde que cuidados tenham sido tomados quanto à origem da matéria prima. O mesmo pode ser aplicado às enzimas microbianas, pois não basta o microrganismo agente da fermentação ser considerado seguro, é preciso que a matéria-prima, usada para suplementar os meios de cultivo e que muitas vezes são subprodutos da agroindústria, não esteja contaminada com substâncias tóxicas (Said & Pietro, 2004).

Alguns microrganismos produzem poligalacturonases constitutivamente, ou seja, mesmo na ausência de compostos pécticos, mas podem ter sua produção aumentada pela adição de pectina, pectato ou ácido poligalacturônico ao meio. Para outros a produção depende da presença de substâncias pécticas no meio de crescimento (Rexová-Benková & Markovic, 1976).

A presença de pectinesterase (PME) foi detectada em microrganismos e plantas superiores (Baron & Thibaut, 1985; Deuel & Stutz, 1958), porém as propriedades físicas e químicas diferem em vários aspectos nestes organismos.

2.7 Microrganismos e substrato sólido

Recentemente, um grande número de microorganismos isolado de diferentes materiais tem sido selecionado por sua habilidade de degradar os polissacarídeos presentes em biomassa vegetal produzindo pectinase em cultura de estado sólido (Soares et al., 2001; Gomes et al., 2001). O uso de resíduos agroindustriais como substratos, também é permitido e estes são de baixo custo e podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, antibióticos, biocombustíveis, proteínas e enzimas (Pandey et al., 2000).

A capacidade dos microrganismos crescerem em materiais ligno-hemicelulósicos pode ser utilizada como uma forma de aproveitamento de resíduos vegetais. A matéria orgânica contida em resíduos agrícolas e agro-industriais, tais como farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, cascas e sementes de frutas, efluentes da fábrica de papel, bagaço de laranja e bagaço de cana de açúcar (Garzón & Hours, 1993) aumenta dia a dia, tornando-se um problema com relação ao espaço para depósito e poluição do meio ambiente. Entretanto, tais resíduos representam uma fonte de crescimento microbiano para a produção de biomassa ou de enzimas. Na maioria dos casos, um simples enriquecimento destes compostos com uma fonte de nitrogênio, mineral ou vitaminas é suficiente para produção de quantidades significativas tanto de biomassa microbiana quanto de atividade enzimática (Bisaria et al., 1981; Elisashvili, 1993).

As pectinases microbianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa (FSM) quanto em estado sólido (FSE). A produção de enzimas por

processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia (Mitchell et al., 2000).

A FES é definida como um processo de fermentação que ocorre na ausência de água livre entre as partículas e na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido (Pandey et al., 2000). A FSM por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água (Mitchell et al., 2000). Na FSM a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato (Mitchell et al., 2000).

O processo de FSE tem se mostrado muito promissor na produção de enzimas fúngicas (Pandey et al., 2000), pois apresenta uma série de vantagens em relação a FSM, como maior concentração de produtos formados, menor espaço requerido para equipamentos, facilidade de extração do produto desejado e diminuição de problemas de contaminação microbiana (Aidoo et al., 1982).

2.8 O setor agroindustrial e os subprodutos agroindustriais

Segundo Salles (1993), o termo agroindústria tem o significado de uma simples indústria que utiliza como matéria-prima os produtos provenientes da agropecuária. Abarca (1999) relata que o setor agroindustrial não é reconhecido pela sociedade como um setor que afeta o meio ambiente. Relata o autor que, talvez seja porque a sociedade valoriza mais a contribuição da atividade agroindustrial na produção de alimentos e é desconhecida, para a maior parte dela, a complexidade dos processos tecnológicos existentes neste tipo de

atividade industrial, como, também, o reconhecimento dos subprodutos poluidores que são depositados no meio ambiente.

Porém as atividades agroindustriais evoluíram rapidamente em suas relações com o meio ambiente. Nos últimos anos tem se intensificado o aproveitamento de resíduos agroindustriais tais como, polpa e cascas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana de açúcar, polpa de beterraba, etc. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar estes materiais na produção de álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e fungos, gerando produtos de maior valor agregado (Espinosa & Cabrera, 1976; Pandey et al., 2000; Rainho et al., 2003; Rolz et al., 1982).

Estima-se que mais da metade dos resíduos gerados permanecem inutilizados cerca de 30 % a 60 % é queimado e o restante ou é incorporado ao solo como adubo ou destinado à produção de ração animal (Rehm & Reed, 1991). No Brasil, a utilização desses subprodutos é ainda irrisória. As empresas mais competitivas no futuro serão aquelas que valorizarem melhor esses subprodutos e resíduos, baixando custo na produção, aumentando a lucratividade e competitividade (Dalsenter, 2000).

2.9 Substratos utilizados na produção de enzimas por microrganismos

Na indústria de alimento, o termo “desperdício” é usado para descrever alguma parte dos materiais não usados ou rejeitados durante o processamento do produto principal. No exemplo de indústrias de polpa de fruta, o desperdício consiste no “bagaço” (resíduo da fruta) obtido durante o processamento da extração da polpa da fruta (Carvalho, 1992).

O processamento de produtos agrícolas para a extração de sucos, óleos e molhos para o consumo humano geram uma grande quantidade de subprodutos oriundos do tratamento industrial, tais como sementes, polpas e cascas

(Carvalho, 1992). Os resíduos agrícolas, florestais e agro-industriais representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir destes materiais resultaria em múltiplos produtos e utilizações. Através de tratamento adequado estes resíduos podem ser convertidos em substratos de cultivo para fungos (Carvalho, 1992).

2.9.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um importante resíduo da agricultura no Brasil, o bagaço é resultante da extração do caldo de cana-de-açúcar e é caracterizado como um alimento com altos teores de parede celular, sendo amplamente empregado na produção de compostos fertilizantes e na produção de cogumelos. A produção anual mundial de cana-de-açúcar é estimada em 775 milhões de toneladas. Após a extração de açúcar, que gira em torno de 82 milhões de toneladas, o restante é bagaço, de acordo com Permana et al. (2000), Segundo Ferreira (1998), a abundante oferta deste resíduo agrícola faz do Brasil um país com grande potencial produtivo; se fossem utilizados 25% a 30% do bagaço produzido teríamos 25 milhões de toneladas de bagaço.

2.9.2 Casca de Maracujá

O maracujá (*Passiflora edulis*) é originário da América Tropical com mais de 150 espécies, muito cultivado no Brasil, rico em vitamina C, cálcio e fósforo. Vários maracujás nativos do Brasil são cultivados em outros países tropicais, tais como o Haváí, Venezuela, África do sul e Austrália, onde tem considerável importância econômica. Dentre os países produtores, o Brasil é o primeiro produtor mundial, com uma área avaliada em 33.000 ha, com produção de aproximadamente 172,3 mil toneladas por ano, desse total 90% da casca de maracujá é desperdiçada, sendo o restante aproveitado para diversos fins

(Oliveira et al., 2002). Cascas e sementes de maracujá, provenientes do processo de corte e extração da fruta para obtenção do suco, são ainda, atualmente, em grande parte descartadas, como este descarte representa inúmeras toneladas, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico.

2.9.3 Bagaço de Laranja

O Brasil é um grande produtor de frutas cítricas, possui um mercado interno de consumo do suco natural em expansão, tendo uma fonte potencial de resíduos dessas frutas. A indústria de suco de laranja produz como subproduto o bagaço de laranja, que compreende 42% do total da fruta (casca, sementes e porção tegumentar), O bagaço de laranja é o principal subproduto da indústria de processamento de citrus e tem mostrado ser uma valiosa fonte de nutrientes, para pesquisa e prática de alimentação, seu valor nutricional com base na matéria seca, é alto (Ashbell et al., 1988). Seu resíduo industrial é rico em alguns componentes como substâncias pécticas, ácido ascórbico, fibras, vitaminas, sais minerais, celulose, hemicelulose e outros. O bagaço de laranja in natura sendo um subproduto da indústria do suco de laranja, é abundante durante sua estação de produção.

2.9.4 Bagaço de Uva

A uva é a matéria-prima utilizada na produção do vinho, uma bebida alcoólica fermentada das mais antigas e de consumo mundial. Também produzida em vários países, a Itália e a França são os principais países produtores, cuja produção anual se aproxima de 10 mil toneladas cada. A produção brasileira gira em torno de 10% da dos principais países produtores (Office International de la Vigne et du Vin, 1999). No processo de fabricação do vinho, cada 1000g de uvas colhidas, após o esmagamento, gera cerca de 350g de

resíduos (cascas, engaços e sementes), que geralmente são jogados nos solos dos parreirais das indústrias vinícolas, servindo apenas como matéria orgânica para fertilização. O bagaço da uva é um abundante subproduto da nossa indústria vitivinícola. O bagaço sendo o principal subproduto da vinificação, segundo o Regulamento (CE) 1493/1999 define-o como o resíduo da prensagem das uvas frescas, fermentado ou não. As tecnologias para o aproveitamento energético da biomassa como: a combustão, gaseificação, geração de biogás e pirolise utilizam o bagaço de uva e outros resíduos vegetais energéticos em quantidade suficiente para assegurar a viabilidade deste tipo de instalações.

2.9.5 Grãos quebrados de Arroz

O arroz apresenta propriedades especiais e pode ampliar suas possibilidades de uso na indústria de alimentos, como alternativa viável para agregar valor aos subprodutos do beneficiamento do arroz. Segundo levantamentos da CONAB, a produção brasileira de arroz foi de $\pm 10.656.100$ toneladas na safra de 2001/02. Ao contrário do que ocorre com o trigo e o milho (transformados em outros produtos antes do consumo), o arroz é consumido no Brasil principalmente na forma de grãos inteiros, descascados e polidos (Castro et al., 1999). O desenvolvimento de produtos mais sofisticados usando o arroz como matéria-prima seria incompatível com o poder de compra da maioria da população mundial, tradicionalmente, consumidora de arroz (Adair, 1972; Castro et al., 1999). Entretanto, é viável o aproveitamento de seu subproduto (Adair, 1972), pois o beneficiamento do arroz resulta em aproximadamente 14% de grãos quebrados (Castro et al., 1999). Uma das alternativas para agregar valor aos grãos quebrados seria transformar essa matéria-prima em substrato com maior interesse industrial e comercial.

2.9.6 Casca de café

A cafeicultura dá origem a um volume elevado de resíduos, principalmente a casca de café, cuja utilização tem sido objeto de vários estudos (Vegro & Carvalho, 1994). A crescente preocupação com os problemas ambientais tem levado a um aumento do interesse sobre a destinação desses resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. Após a colheita, (Bartholo et al., 1989) apontam a polpa, a mucilagem, o pergaminho e a casca como resíduos originados de formas diferentes de beneficiamento do café. No Brasil, a forma mais comum de preparo de café ocorre por via seca (fruto de café seco ao sol ou em pré-secadores e secadores artificiais), resultando em resíduos formados por casca e pergaminho, com rendimento de aproximadamente 50% do peso colhido. Em países da América Central, México, Colômbia, Quênia e África do Sul, o café-cereja é preparado por via úmida, sendo despulpado antes da secagem, resultando em resíduos formados por mucilagem e polpa (não contém pergaminho, pois este se adere ao fruto). (Caielli, 1984) cita que as composições químicas da casca e da polpa de café são semelhantes, apesar de a casca apresentar maior porcentagem de matéria seca, o que favorece o tempo de estocagem e armazenamento.

A utilização de resíduos agroindustriais provenientes de indústrias processadoras, de frutas e grãos pode consistir em uma alternativa para promover a redução dos custos de produção de enzimas e evitar problemas de poluição que possam causar.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, C. D. G. **Agroindústria e meio ambiente na experiência brasileira**. COPPE/UFRJ, 1999. Disponível em: <<http://www.produto.ufrj.br/abepro/enegep96/2/A>>. Acesso em: 2006
- ADAIR, C. R. Production and utilization of rice. In: HOUSTON, D. F. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1972. p. 1-12.
- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, J. B. Solid substrate fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 28, p. 201-237, 1982.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; HOLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 21-28, Jan. 1998.
- ALTAMIRANO, M. M.; BLACKBURN, J. M.; AGUAYO, C.; FERSHT, A. R. Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. **Nature**, London, v. 403, n. 6.770, p. 617-622, Feb. 2000.
- ASHBELL, G.; WEINBERG, Z. G. Orange peel: the effect of blanching and calcium hydroxide addition on ensiling losses. **Biological Wastes**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 73-77, 1988.
- BARACAT, M. C.; VALENTIM, C.; MUCHOVEJ, J. J.; SILVA, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, London, v. 2, n. 12, p. 899-902, Dec. 1989.
- BARACAT-PEREIRA, M. C.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibres. **Letters Applied of Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 127-129, Mar. 1994.
- BARON, A.; THIBAUT, J. F. Les enzymes pectinolytiques. In: MOURANCHE, A.; COSTES, C. (Ed.). **Hydrolases et dépolymérasés: enzymes d'intérêt industriel**. Paris: Gauthier Villars, 1985. 219 p.

BARTHOLO, G. F.; MAGALHÃES FILHO, A. A. R.; GUIMARÃES, P. T. G.; CHALFOUN, S. M. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 162, p. 33-34, 1989.

BELDMAN, G.; ROMBOUSTS, F. M.; VORAGEM, A. G. J.; PILNIK, W. Application of cellulose and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, Wobourn, v. 6, n. 11, p. 503-507, 1984.

BENEN, J. A.; VINCKEN, J. P. Microbial Pectinases. In: SEYMOUR, G.; KNOX, P. (Ed.). **Pectins and their manipulation**. Sheffield: Academic Press, 2002.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of Cellulosic Materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, Wobourn, v. 3, n. 2, p. 90-104, 1981.

BLANCO, P. et al. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 11, p. 974-977, Nov. 1994.

BOYLE, F. P.; SHAW, T. N.; SHERMAN, G. D. Efficient extraction single strength technique open up wide uses for new passion fruit juice. **Food Engineering**, New York, v. 27, n. 9, p. 94-97, 1955.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introducion a la bioquímica de los alimentos**. 2. ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1980. 357 p.

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

CAIELLI, E. L. Uso da casca de palha de café na alimentação de ruminantes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 119, p. 36-38, nov. 1984.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. In: SIMPÓSIO SOBRE UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E RESÍDUOS DE COLHEITA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 1992, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa-UEPAE São Carlos, 1992. p. 7-27.

CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. **Qualidade de grãos em arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30 p.

DALSENTER, F. D. H. **Contribuição ao Estudo da Aplicação da Proposta ZERI para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico**. 2000. 127 p Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, jul./dez. 1997.

DEKKER, R. F. H. Enzymes in food beverage processing – 2. **Food Australia**, Australia, v. 46, p. 179-181, 1994.

DEUEL, H.; STUTZ, E. Pectic substance and pectic enzymes. **Advances in Enzymology**, New York, v. 20, p. 341-82, 1958.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalysts for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, Jan. 1991.

ELISASHVILI, V. I. Biosynthesis and properties of Cellulases and Xylanases of higher Basidiomycetes (Review). **Applied Biochemistry Microbiology**, New York, v. 29, p. 257-266, 1993.

ESPINOSA, R. E CABRERA, S. Protein from waste. **Chemtech**, Washington, v. 6, p. 636-642, 1976.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; AMORIN, A. C. R.; CHAVES-ALVES, V. M.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O.; ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 15-18, jan./mar. 1996.

FERREIRA, J. E. F. **Produção de cogumelos**. São Paulo: Editora Agropecuária, 1998. 136 p.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 165-186, 1986.

GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 93-95, 1992.

GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T. (Ed.). **Industrial enzymology**. 2. ed. London: Macmillan Press, 1996. p. 120-138.

GOMES, E.; IEMBO, T.; SILVA, R. Production, characterization and properties of depolymerising enzymes from a *Curvularia inaequalis* strains. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 46, n. 4, p. 303-308, 2001.

GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. **Introduction to plant biochemistry**. Oxford: Pergamon Press, 1982. 667 p.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, Bronx, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HENNIES, P. T. **Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

HORN, D.; LINHART, F. **Retention aids**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1996. (Paper Chemistry).

HOURET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides .3. molecular-size of heterogeneous pectin chains - calibration and application of sec to pectin analysis **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 409-432, 1991.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227, May 2001.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 345-351, Aug. 2002.

LEUCHTENBERGER, A.; MAYER, G. Changed pectinase synthesis by aggregated mycelium of some *Aspergillus niger* mutants. **Enzyme Microbiology Technology**, Wobourn, v. 14, n. 1, p. 18-22, Jan. 1992.

LINKO, M.; POUTANEN, K.; VIKARI, L. New developments in the application of enzymes for biomass processing. In: COUGHLAN, M.P. (Org.). **Enzyme systems for lignocellulose degradation**. Londres: Elsevier Applied Science, 1989.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, July 2000.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. **Bulletin de l'O. I. V.** Paris: Office International de la Vigne et du Vin, 1999. (supplement).

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 259-262, set./out. 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PERMANA, I. G.; FLACHOWSKY, G.; MEULEN, U. ter; ZADRAZIL, F. Use of sugarcane bagasse for mushroom and animal feed production. **Mushroom Science**, Amsterdam, v. 15, part I, p. 385-390, 2000.

PETER, J. Enzymic treatment of tropical fruit for improvement of concentration capability and sediment stability of the pulp and juice. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 19, p. 81-87, 1986.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F. M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G. C.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. (Ed.). **Enzymes and food processing**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 105-128.

PILNIK, W.; VORAGEN, A. G. J. Pectic enzymes in fruit juice and vegetable juice manufacture. In: NAGODAWITHAMA, T.; REED, G. (Ed.). **Enzymes in food processing**. New York: Academic Press, 1993. p. 79-82.

PHUTELA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 63-69, Jan./ Mar. 2005.

RAINHO, J. C. N.; CHUONG, W.; EPOSITO, E. Fermentação Sólida da Borra de Café para Produção de *Pleurotus ostreatus*. **SINAFERM**, 2003.

REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**: a comprehensive treatise. Florida: Delwegg, 1991. 187 p.

REGULAMENTO (CE) n.º 1493/1999 do Conselho. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias** (PT) L179 – 14. 7. 1999, pp. 1-84.

REID, I.; RICARD, M. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, Wobourn, v. 26, n. 2/4, p. 115-123, 2000.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARCOVIC, O. Pectic enzymes. In: TIPSON, R. S.; HORTON, D. (Ed.). **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York: Academic Press, 1976. p. 323-385.

ROLIN, C.; NIELSEN, B. U.; GLAHN, P. E. Pectin. In: **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. Estados Unidos: Marcel Dekker, 1998.

ROLZ, C.; MENCHÚ, J. F.; CALZADA, F.; LÉON, R.; De e GARCÍA, R. Biotechnology in washed coffee processing. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 8-10, 1982.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológico**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. v. 01, 416 p.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 213-294, 1993.

SALLES, L. S. **Elementos para o planejamento ambiental do complexo agroindustrial sucroalcooleiro no Estado de São Paulo: conceitos, aspectos e métodos**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

SALUNKHE, D. K.; BOLIN, H. R.; REDDY, N. R. **Storage processing and nutritional quality of fruits and vegetables: fresh fruits and vegetables**. 2. ed. Boston: CRC Press, 1991. v. 1, 323 p.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microorganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 835-842, set./out. 2003.

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman and Hall, 1993.

SILVEIRA, F. Q. P. **Purificação e caracterização de uma β -xilanase termoestável de *Trichoderma harzianum***. 1997. 76 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília. Departamento de Biologia Celular, Brasília.

SIMS, C. A.; BATES, R. P. Challenges to processing tropical fruit juices: banana as an example. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 107, p. 315-319, 1994.

SOARES, M. M. C. N. et al. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potencial application on juice extraction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 79-82, Feb. 2001.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microorganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382-385, out./dez. 1998.

STRASSER, G. R.; AMADÒ, R. Pectic substances from red beet (*Beta vulgaris conditiva*). Part I. Structural analysis of rhamnogalacturonan I using enzymic degradation and methylation analysis. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 63-70, Jan. 2001.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHIS, M. G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 182-190, Jan. 2001.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 4, p. 338-344, Aug. 2002.

VEGRO, C. L. R.; CARVALHO, F. C. de. Disponibilidade e utilização de resíduos no processamento agro-industrial do café. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 9-16, jan. 1994.

WALSH, G.; HEADON, D. **Protein biotechnology**. Inglaterra: Wiley Publishers, 1994.

WHITAKER, J. Microbial Pectinolytic enzymes. In: _____. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 1990a.

CAPÍTULO II

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”

RESUMO

COSTA, Livia Martinez Abreu Soares. In: **Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico “G088”**. 2007. Cap.2, p.38-86. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Enzimas são de grande importância em processos industriais, em razão de sua especificidade e de seu potencial catalítico, em inúmeras reações celulares. As enzimas pectinolíticas catalisam a degradação de polissacarídeos pectínicos, e são essenciais na indústria de alimentos e indústria têxtil. Os microrganismos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, são excelentes decompositores de material orgânico, sendo utilizados por indústrias, na produção de enzimas pectinolíticas. A utilização de substratos sólidos para a produção de enzimas pectinolíticas oferece um grande número de vantagens sobre o método de fermentação submersa e líquida convencional. O meio de produção é simples, utilizando resíduos vegetais de uva, café, maracujá, laranja ou subprodutos como farelo de trigo, arroz ou bagaço da cana de açúcar. A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar substratos alternativos e solucionar problemas de poluição que possam causar. Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial do agente biológico na produção de enzimas pectinolíticas a partir de subprodutos agroindustriais e seus resíduos utilizados como substratos. A primeira etapa foi inocular o agente biológico “G088” nos diferentes substratos: bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar, casca de uva, casca de maracujá, casca de café e o arroz. As atividades enzimáticas da poligalacturonase (PG) e pectina metil esterase (PME) dos substratos foram avaliadas, o melhor resultado para cada enzima foi em função do tempo de cultivo e do tipo de substrato. Todos os substratos produziram pectinases, poligalacturonase (PG) e pectina metil esterase (PME), com destaque para a casca de uva e arroz. O melhor substrato para produção de PG (117,35 U/g) e PME (1760 U/g) aos 14 dias foi à casca de uva. A composição do substrato tem influência direta na produção de PG e PME.

* Comitê de Orientação: Carlos José Pimenta - UFLA (Orientador); Sára Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-orientadores)

ABSTRACT

COSTA, Livia Martinez Abreu Soares. In: **Utilization of agroindustrial residues as substrates for production of pectinolytic enzymes by biological agent “G088”**. 2007. Cap.2, p.38-86. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Enzymes are of great importance in industrial processes on the account of their specificity and their catalytic potential in a number of cell reactions. The pectinolytic enzymes catalyze the degradation of pectic polysaccharides and are essential in food industry and textile industry. Microorganisms as related with their reproduction and growth characteristics adapt themselves to a great diversity of substrates, they are excellent decomposers of organic material, their being utilized by industries, in the production of pectinolytic enzymes. Use of solid substrates for production of pectinolytic enzymes offers a great number of advantages over the method of conventional submerge and liquid fermentation. The production mean is simple, utilizing plant residues of grape, wheat meal, rice or sugar cane bagasse. The application of residues is way of utilizing alternative substrates and solving pollution problems with they can cause. It was aimed by this work to evaluate the potential of the biological agent in the production of pectinolytic enzymes from agroindustrial substrates and their residues as substrates. The first step was inoculating biological agent “G088” in the different substrates: orange bagasse, sugar cane bagasse, grape skin, passion fruit skin, coffee and rice hull. The enzymatic activities of polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME) of the substrates were evaluated; the best result for each enzyme was related with cropping time and sort of substrate. All the substrates produced pectinases, polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME), standing out grape skin and rice hull. The best substrate for production of PG (117.35 U/g) and PME (1760 U/g) at 14 days was grape skin. The composition of the substrate has a direct influence on the production of PG and PME.

* Committee Guidance: Carlos José Pimenta - UFLA (Adviser); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-advisers)

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois aceleram as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. Através desta definição, fica subentendido que a atuação das enzimas ocorre dentro dos sistemas vivos. Porém, a partir de meados do século XX, com avanços tecnológicos e científicos em áreas como a bioquímica, as enzimas passaram a ser extraídas das células produtoras e a ocupar também um papel importantíssimo em produtos e processos industriais. Além disso, com seu uso, as enzimas abriram a possibilidade de diminuir rejeitos industriais que podem comprometer o meio ambiente.

A demanda mundial por processos otimizados na transformação de biomassa em produtos diversificados e de maior valor agregado, tem resultado no uso de enzimas em diversos processos industriais.

As enzimas de origem microbiana ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, sendo inúmeras as aplicadas em processos industriais e comercializadas em grandes quantidades, como as pectinases, por exemplo.

As pectinases são um grupo de enzimas utilizadas principalmente na indústria de alimentos (processamentos de frutos e legumes), com um enfoque na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas. Além disso, são úteis na extração de óleo vegetal e indústria têxtil e de celulose e papel (Soares et al., 2001). Grande parte dessas enzimas é de origem microbiana (fungos e bactérias) e extracelular, sendo que estes microrganismos podem ser inoculados em meios contendo resíduos agroindustriais.

Resíduos agroindustriais como casca de café, casca e bagaço de frutas cítricas, farelo de trigo, bagaço de uva, bagaço de mandioca, bagaço de

beterraba, podem ser utilizados como substratos em bioprocessos para a produção de compostos de maior valor agregado como enzimas, etanol, proteínas, ácidos orgânicos e compostos de aroma, desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (Blandino et al., 2001; Bravo et al., 2000; Soccol & Vandenberghe, 2003).

Tem havido presentemente uma consciência maior no uso do desperdício industrial. A utilização de resíduos provenientes de indústrias processadoras de frutas e grãos pode consistir em uma alternativa para promover a redução dos custos de produção da enzima e evitar problemas de poluição que possam causar. O interesse em utilizar o substrato sólido para a produção de compostos de importância comercial é uma consequência da demanda por insumos de menor custo.

Portanto, levando em consideração o aproveitamento dos subprodutos agroindustriais e o potencial biotecnológico do agente biológico “G088”, sendo que este é de fácil obtenção, apresenta rápido crescimento, é fonte de enzimas e é livre de metabólitos tóxicos, objetiva-se avaliar o potencial de produção de enzimas pectinolíticas, pelo agente biológico “G088” a partir de subprodutos agroindustriais e seus resíduos utilizados como substratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Análise de Alimentos, do departamento de Ciência dos Alimentos e Microbiologia da EPAMIG na Universidade Federal de Lavras - UFLA.

O arroz, as frutas (laranja, maracujá e uva) e o bagaço de cana-de-açúcar foram adquiridos no comércio local no município de Lavras, MG, a casca melosa de café foi adquirida na fazenda “Ponte do Funil”, no município de Perdões-MG.

O arroz, os resíduos e as frutas foram manipulados no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG-UFLA. As frutas foram lavadas e retiradas os subprodutos:

- na laranja: o bagaço com o albedo sem a casca
- no maracujá: a casca e albedo
- na uva somente a casca.

O bagaço da cana-de-açúcar foi utilizado sem o caldo e para o substrato de café foi aproveitada a casca melosa. O arroz utilizado foi o “integral” polido.

As amostras de bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, casca de maracujá, casca melosa de café e as cascas de uva foram passadas em multiprocessador para se obter porções menores e homogêneas de cada resíduo.

Cada amostra foi dividida em porções de 100g com 3 (três) repetições as quais foram analisadas em 3 (três) tempos diferentes (1º Tempo com 7 dias, 2º Tempo com 14 dias e 3º Tempo com 21 dias). Depois das amostras pesadas (100g) e colocadas nos frascos de 500ml, elas passaram pelo processo “esterilização” a 120°C por 20 minutos em autoclave. Somente o arroz foi

pesado com 70g, pois neste acrescentou-se 30ml de água. Após a esterilização dos substratos foi inoculado o agente biológico “G088”. As repetições de cada substrato foram separadas pelos tempos 7, 14 e 21 dias e colocados em estufa BOD, 25 °C com umidade controlada e fotoperíodo de 12 horas para desenvolvimento do agente biológico “G088”. Durante o período experimental, efetuou-se o monitoramento diário do desenvolvimento do agente biológico nos substratos. Após cada tempo de cultivo determinado foram retiradas as amostras de cada substrato para posteriores análises químicas e bioquímicas no Laboratório de Análise de Alimentos do DCA-UFLA.

2.2 Agente biológico “G088”

O “G088” é um isolado de um microrganismo, obtido por estudos anteriores dentre 8 isolados diferentes, parte de outra dissertação, segundo o potencial de desenvolvimento e produção de enzimas. Após sua seleção foram realizadas algumas modificações para melhorar sua eficiência. O gênero e espécie do microrganismo não serão revelados a princípio, em função de se tratar de objeto de patente que se encontra em fase de registro. Sendo assim, tão logo haja liberação, sua identidade será revelada e publicada.

2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido segundo um delineamento experimental inteiramente casualizado em que os tratamentos foram arrançados segundo um esquema fatorial 6x3 (6 substratos e 3 tempos de incubação). As análises estatísticas das avaliações químicas e bioquímicas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Sistema de Análise de Variância (SISVAR).

O modelo estatístico que descreve o experimento é o seguinte:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}, \text{ em que:}$$

y_{ijk} é o valor da variável dependente no i-ésimo substrato, no j-ésimo tempo de armazenagem e k-ésima repetição, com $k = 1, 2, 3$;

μ é o valor médio;

α_i é o efeito do i-ésimo substrato, com $i = 1, \dots, 6$;

β_j é o efeito do j-ésimo tempo de armazenagem, com $j = 1, 2, 3$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo substrato e j-ésimo tempo de armazenagem;

ε_{ijk} é o erro experimental associado ao valor da variável dependente no i-ésimo substrato, j-ésimo tempo de armazenagem e k-ésima repetição, normalmente distribuído com média zero e variância σ^2 .

2.4 Metodologia analítica

Além da atividade enzimática, foram determinados também outros parâmetros físico-químicos e químicos, com a finalidade de se estabelecer suas possíveis correlações. Os parâmetros analisados estão relacionados a seguir:

2.4.1 Pectinametilesterase

2.4.1.1 Obtenção do extrato enzimático da pectinametilesterase

O extrato enzimático foi obtido e determinado pelo método descrito por Buescher & Furmanski (1978).

2.4.1.2 Atividade da pectinametilesterase

A atividade da pectinesterase foi determinada por titulação dos grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina devido à ação da enzima, pectinametilesterase (PME), de acordo com o método descrito por JEN &

Robinson (Jen & Robinson, 1984). Utilizou-se como substrato uma solução de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2N, pH 7,0, à temperatura ambiente. A taxa de desmetilação da pectina, adicionada ao extrato enzimático, foi medida pela titulação da mistura de reação com NaOH 0,01N, mantendo-se o pH 7,0 por 10 min. A unidade de atividade enzimática (UAE) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalisar a desmetilação de pectina correspondente a 1 nanomol de NaOH nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática por minuto por grama de peso fresco ($U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

2.4.2 Poligalacturonase

2.4.2.1 Obtenção do extrato enzimático da poligalacturonase

O extrato enzimático foi obtido e determinado pelo método descrito por Buescher & Furmanski (1978).

2.4.2.2 Atividade da poligalacturonase

A atividade da poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida dos grupos redutores liberados do ácido poligalacturônico, segundo metodologia de Pressey & Avants (Pressey & Avants, 1973). A atividade foi determinada incubando-se o extrato enzimático com solução de ácido poligalacturônico a 0,25%, em tampão acetato de sódio 37,5 mM, pH 5, a 30°C, por 3 h. A reação foi interrompida em banho-maria fervente. Os grupos redutores foram determinados segundo a técnica descrita por Somogyi modificada por Nelson (Nelson, 1944), usando-se ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (UAE) foi definida como sendo a capacidade da enzima em catalisar a formação de um nanomol de ácido galacturônico por minuto de reação.

2.4.3 Pectinas total e solúvel

As pectinas, total e solúvel, foram extraídas segundo a técnica descrita por McCready & McComb (1952) e determinadas colorimetricamente segundo Bitter & Muir (1962). Os resultados foram expressos em mg de ácido galacturônico por 100g de polpa.

2.4.4 pH

O pH foi determinado utilizando-se um pHmetro Schott Handylab, segundo técnica da AOAC (1992).

2.4.5 Acidez titulável (AT)

A acidez total titulável foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 N e indicador fenolftaleína, padronizada segundo técnica estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Os resultados foram expressos em % .

2.4.6 Umidade

Determinada pela perda de peso em estufa regulada a 60° C até peso constante.

2.4.7 Extrato etéreo

Feita através de extração contínua em aparelho tipo SOXHLET, segundo a AOAC (1990).

2.4.8 Proteína bruta

Determinada pelo método de MICRO-KJELDAHL, descrito pela AOAC (1990).

2.4.9 Fibra

Determinada por meio da hidrólise ácida, segundo AOAC (1990).

2.4.10 Fração cinza

Determinada pelo método gravimétrico com aquecimento a 550°C através de mufla e, posteriormente, utilizando balança analítica, segundo a AOAC (1990).

2.4.11 Açúcares solúveis totais

Açúcares solúveis totais foram extraídos com álcool etílico e determinados pelo método de Antrona (Dishe, 1962). Os resultados foram expressos em gramas de glucose por 100g de polpa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Açúcar total e Composição Centesimal dos substratos antes da inoculação do agente biológico “G088”

De acordo com as análises, os substratos apresentaram bons valores nutricionais em suas composições, que estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 – Valores médios de açúcar, em g/100g, umidade e extrato etéreo, em porcentagem, em função dos substratos estudados. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Médias (erros-padrão)		
	Açúcar	Umidade	Extrato etéreo
Bagaço de cana-de-açúcar	16,26 (0,73) b	25,68 (0,16) f	1,41 (0,05) c
Casca de uva	37,45 (0,73) a	87,44 (0,16) b	2,96 (0,05) b
Arroz	0,51 (0,73) d	56,50 (0,16) e	1,27 (0,05) c
Casca de maracujá	9,96 (0,73) c	85,63 (0,16) c	0,78 (0,05) d
Casca de café	0,71 (0,73) d	83,88 (0,16) d	3,71 (0,05) a
Bagaço de laranja	17,75 (0,73) b	89,41 (0,16) a	0,78 (0,05) d

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 3 – Valores médios de fração protéica, fibra bruta e cinzas, em porcentagem, em função dos substratos estudados. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Médias (erros-padrão)		
	Fração protéica	Fibra bruta	Cinzas
Bagaço de cana-de-açúcar	2,40 (0,16) e	24,75 (0,34) c	0,93 (0,16) e
Casca de uva	5,53 (0,16) d	12,95 (0,34) e	4,47 (0,16) c
Arroz	9,52 (0,16) b	1,38 (0,34) f	0,52 (0,16) e
Casca de maracujá	7,49 (0,16) c	41,72 (0,34) a	5,17 (0,16) b
Casca de café	15,16 (0,16) a	22,05 (0,34) d	7,96 (0,16) a
Bagaço de laranja	7,98 (0,16) c	28,95 (0,34) b	2,16 (0,16) d

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

Observou-se que o agente biológico “G088” cresceu em todos os tipos de substratos (diferentes fontes de carbono) e apresentou atividade enzimática em todos eles, apesar das diferentes combinações de componentes verificados nos substratos. A casca da uva teve uma boa quantidade de açúcar influenciando positivamente as atividades das pectinases. A casca do maracujá, o bagaço da laranja, a casca de café e o bagaço de cana-de-açúcar tinham muita fibra para desenvolvimento do agente biológico. Além do açúcar, fibras e fração protéica, os substratos também continham minerais em sua composição. No trabalho de Geoczze (1994) apresentaram também crescimento do *Penicillium expansum* em todas as combinações de fontes de carbono com síntese indutiva de poligalacturonase, sendo que, a maior produção de biomassa foi obtida no meio

de crescimento preparado com sacarose e glicose, porém a presença desses açúcares como única fonte de carbono reprimiu completamente a produção de PG.

3.2 Enzimas pectinolíticas

3.2.1 Atividade enzimática dos substratos antes da inoculação do agente biológico “G088”

Após a preparação dos substratos, foram determinadas as atividades de pectinametilsterase (PME) e poligalacturonase (PG) no período inicial (representados Tabela 4), antes da inoculação do agente biológico para posteriores comparações desses valores, com os obtidos nas atividades enzimáticas dos substratos com inóculo.

TABELA 4 – Valores médios das atividades de PG e PME (U/min/g de amostra) sem inóculo. UFPA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Atividade Enzimática	
	PG	PME
Bagaço de cana-de-açúcar	17,7090	0
Casca de uva	10,8507	880.000
Arroz	6,1970	0
Casca de maracujá	6,3890	0
Casca de café	8,0816	80.000
Bagaço de laranja	16,8103	0

3.2.2 Atividade da poligalacturonase (PG)

Os dados referentes às atividades da poligalacturonase (PG) nos diferentes substratos e nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 5 e Figura 5.

TABELA 5 – Valores médios de atividade PG (U/min/g de amostra), em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	91,07 (0,39) b	76,09 (0,39) c	22,65 (0,39) e	63,27 (0,23)
Casca de uva	47,12 (0,39) f	117,35 (0,39) a	71,90 (0,39) b	78,79 (0,23)
Arroz	95,42 (0,39) a	66,29 (0,39) d	36,11 (0,39) d	65,94 (0,23)
Casca de maracujá	77,79 (0,39) c	57,11 (0,39) e	47,26 (0,39) c	60,72 (0,23)
Casca de café	69,31 (0,39) d	49,31 (0,39) f	37,03 (0,39) d	51,89 (0,23)
Bagaço de laranja	63,42 (0,39) e	80,58 (0,39) b	99,57 (0,39) a	81,19 (0,23)
Médias (Erro-padrão)	74,02 (0,16)	74,46 (0,16)	52,42 (0,16)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

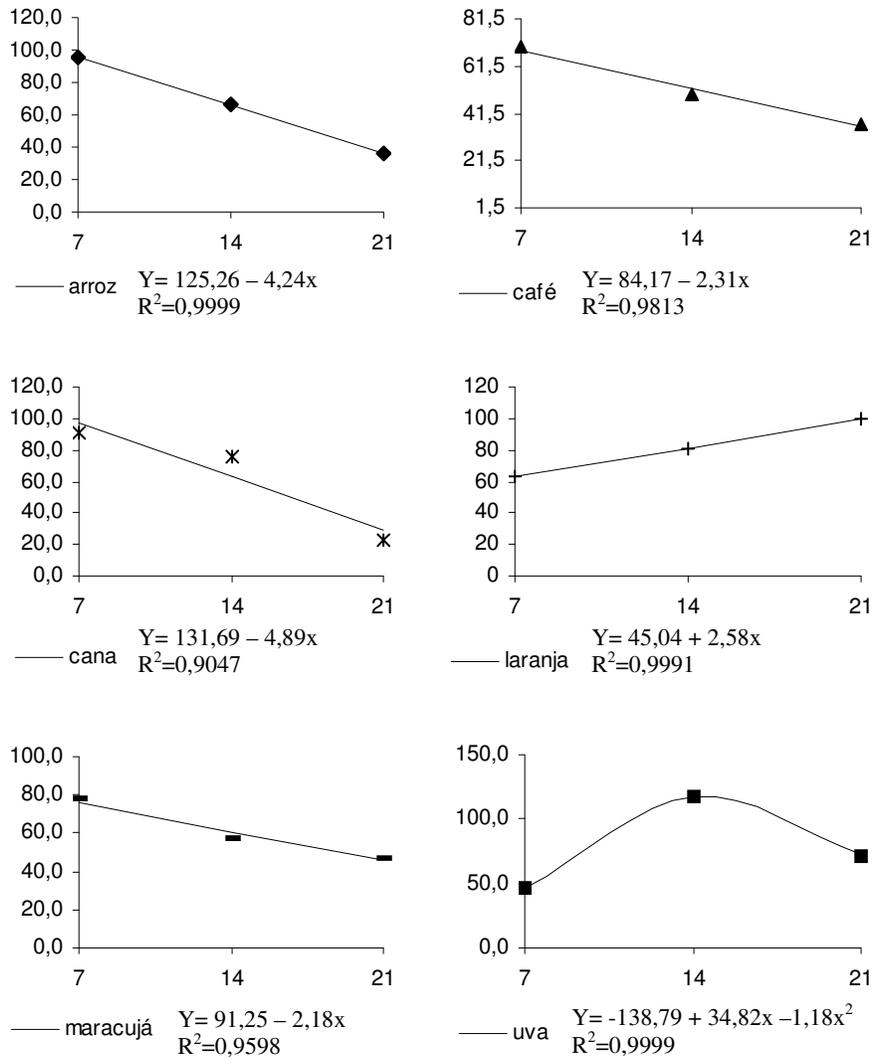


FIGURA 5 – Valores médios de atividade PG, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.

Tanto o tipo de substrato quanto o tempo de cultivo do agente biológico apresentaram diferenças quanto a variável analisada ($p < 0,05$).

Os resultados da Tabela 5 indicam que a maior atividade enzimática da PG obtida foi para a casca de uva com 14 dias de cultivo com o valor médio de 117,35U/g. Com 7 dias de cultivo todos os substratos tiveram bons resultados sendo que a maior atividade neste tempo foi de 95,42 U/g para o arroz. O bagaço da laranja foi o único substrato com aumento em sua atividade, e teve a melhor atividade com 99,57 U/g de PG em 21 dias de cultivo. Na Tabela 5 observa-se que, com 7 dias de cultivo o pior substrato foi o bagaço da laranja, com 14 dias foi a casca de maracujá e com 21 dias o substrato da cana-de-açúcar.

Os dados obtidos na Figura 5 mostram que houve uma queda na atividade de PG para o arroz, casca de café, bagaço de cana-de-açúcar e casca de maracujá com o Tempo de cultivo do agente biológico, possivelmente a composição dos substratos afetou a capacidade de desenvolvimento do agente biológico com o aumento do tempo. Para o bagaço da laranja a atividade de PG aumentou com o tempo de cultivo do agente biológico, provavelmente pelo fato de seu substrato apresentar boa quantidade de pectina total sendo que a quantidade de pectina solúvel foi alta nos três tempos de cultivo.

A casca de uva teve sua atividade máxima de PG com 14 dias de crescimento e teve um decréscimo após esse máximo de produção, esse pico deve-se ao aumento da solubilidade da pectina aliado ao pH que em 14 dias estava próximo do ideal. Martin et al. (2004), em estudo com produção de pectinase por cepas fúngicas em fermentação de estado sólido usando subproduto agroindustrial apresentaram picos de produção de PG para diferentes dias de cultivo, na produção de PG pela *Moniliella sp* atingiu o pico entre o 3º e o 4º dias de cultivo com a atividade máxima de PG 26Uxg-1. Quando o *Penicillium sp* EGC5 foi usado, detectou-se atividade máxima de PG (12 Uxg-1) no 8º dia.

Martin et al. (2004) mostraram que as misturas de bagaço de laranja e farelo de trigo são o melhor meio para a produção de pectinase com 55,2U de PG por grama de substrato. Em geral concorda-se que o meio ótimo para o aumento da produção de pectinase extracelular é o que contém materiais pécnicos como indutor (Crotti et al., 1999; Galiotou-Panayotou et al., 1993). O bagaço de laranja tem sido indicado como indutor de pectinase por vários autores (Ismail, 1996; Martin et al., 2004; Martins et al., 2002; Rizzatto, 1999; Silva et al., 2002).

De acordo com Silva et al. (2002), o fungo *Penicillium viridicatum* “RFC3”, quando cultivado em meios contendo farelo de trigo, bagaço de laranja, tegumento de milho, cascas de banana e de manga ou mistura destes materiais com bagaço-de-cana (50% peso/peso) produziram PG. A produção de PG pelo *Penicillium viridicatum* “RFC3” usando bagaço de laranja (BL) e bagaço de cana-de-açúcar foi influenciada pela composição dos meios, atingidos valores maiores em mistura com farelo de trigo.

3.2.3 Atividade da pectina metil esterase (PME)

Os dados referentes às atividades da pectinametilesterase (PME) nos diferentes substratos e nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 6 e Figura 6.

TABELA 6 – Valores médios originais de atividade PME em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	240 (2,38) d	160 (2,20) d	0 (0,00) e	133 (1,53)
Casca de uva	1760 (3,26) a	1600 (3,20) a	1120 (3,05) a	1493 (3,17)
Arroz	1040 (3,02) b	560 (2,75) b	506 (2,70) b	702 (2,82)
Casca de maracujá	160 (2,20) e	80 (1,90) e	0 (0,00) e	80 (1,37)
Casca de café	560 (2,75) c	320 (2,50) c	106 (2,00) d	329 (2,42)
Bagaço de laranja	240 (2,38) d	320 (2,50) c	160 (2,20) c	240 (2,36)
Médias (Erro-padrão)	667 (2,66)	507 (2,51)	315 (1,66)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

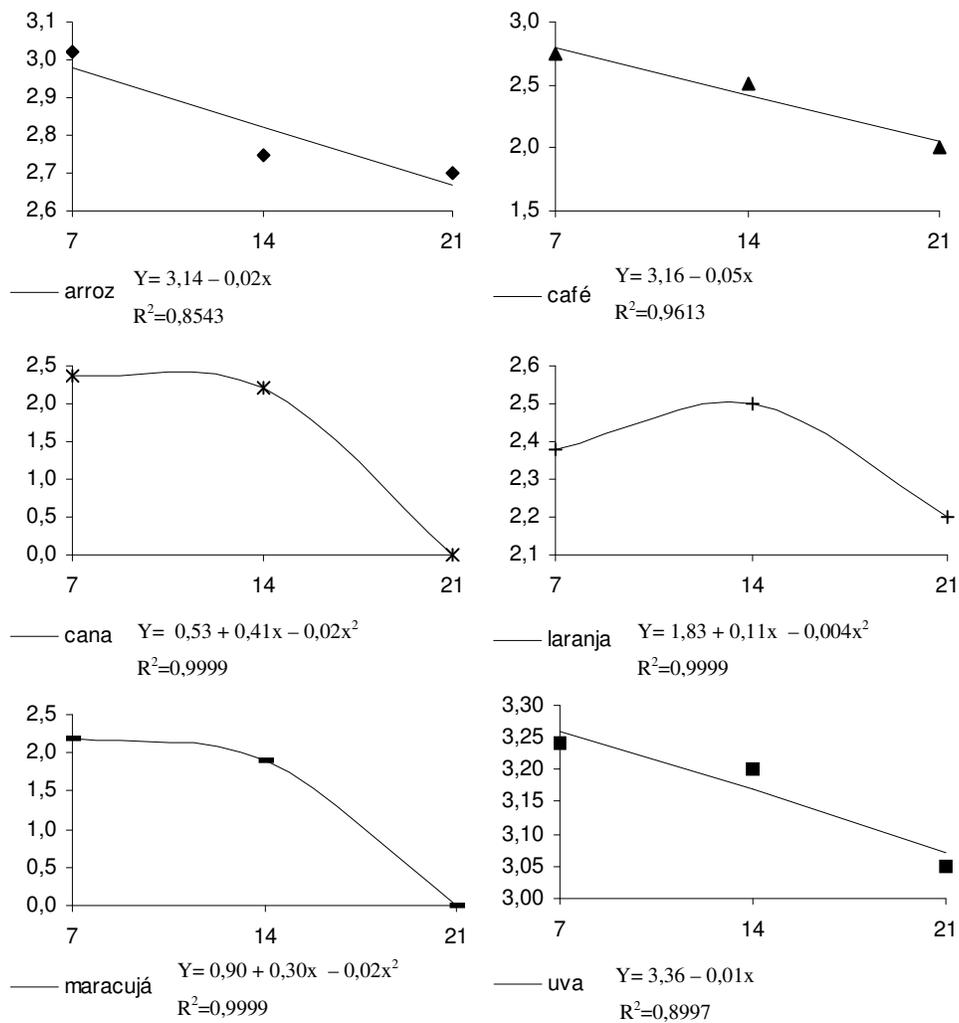


FIGURA 6 - Valores médios de atividade PME, transformados por $\log_{10}(y+1)$, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.

No que se refere à atividade da pectina metil esterase PME, os resultados expressos na Tabela 6 mostram haver diferença entre os tipos de substrato, com melhores atividades nos três tempos para o arroz e a casca de uva. Em 7 dias obteve-se 1760 U/g e 1040 U/g, em 14 dias 1600 U/g e 560 U/g e em 21 dias 506 U/g e 1120 U/g de PME para casca de uva e arroz respectivamente.

Além de o arroz apresentar boa quantidade de proteína, sua umidade aproxima-se da ideal de acordo com Martin et al. (2004), que encontrou 67% de teor final de umidade do meio. A casca de uva tem alta umidade, porém apresenta uma ótima quantidade de açúcar aliado ao seu valor de pH. Na Tabela 6 os dados mostram que para 7 e 14 dias de cultivo a casca de maracujá foi o pior substrato. Com 21 dias o bagaço da cana-de-açúcar e a casca de maracujá não apresentaram atividade da PME.

Os resultados da Figura 6 indicam também uma queda na atividade da enzima para os substratos do arroz, casca de café, bagaço de cana-de-açúcar, casca de maracujá e casca de uva com o tempo de cultivo do agente biológico, este fato pode ter sido ocasionado por limitação das fontes de carbono do meio.

Para o bagaço da laranja verificou um aumento na atividade desta enzima no tempo de cultivo de 14 dias com posterior declínio no último tempo de cultivo, provavelmente relacionado com a atividade de PG e sua composição, pois teve o mesmo pico em 14 dias nas atividades de PG e PME. O declínio da atividade do bagaço da laranja com 21 dias na PME pode ter ocorrido devido a algum inibidor.

Os substratos bagaço da cana-de-açúcar e casca de maracujá não tiveram atividade enzimática em 21 dias de cultivo devido a possível instabilidade do substrato, a perda de água dos meios, a presença de proteases e acúmulo de metabólitos.

No trabalho de Teixeira et al. (2000), em estudo com pectinases, foi verificado que entre as fontes de carbono, com 5% de pectina depois de 72 h de incubação apresentou a melhor atividade de pectina metil esterase (5.7 U/ml). Na presença do mesmo substrato, depois de aumentar (dobro) e diminuir (metade) a concentração, a atividade da pectina metil esterase foi reduzida depois de 48 h para 39% e 30%, respectivamente. Em relação ao trabalho citado os resultados indicam também uma repressão enzimática após certo tempo de cultivo entre os substratos, provavelmente devido à presença da pectina e degradação de seus produtos com a ação de inibidores da enzima ou as diferentes formas moleculares da pectina metil esterase que são sensíveis aos componentes do meio.

3.3 Substâncias pécticas

3.3.1 Pectina solúvel

Os dados referentes à quantificação de pectina solúvel nos diferentes substratos, nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 7 e Figura 7.

TABELA 7 – Valores médios de pectina solúvel, em mg/100g, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	201,08 d (10,11)	183,66 d (10,11)	96,49 e (10,11)	160,41 (5,84)
Casca de uva	764,90 a (10,11)	459,88 b (10,11)	189,54 d (10,11)	471,44 (5,84)
Arroz	297,67 c (10,11)	364,04 c (10,11)	198,80 d (10,11)	286,84 (5,84)
Casca de maracujá	784,88 a (10,11)	382,79 c (10,11)	240,35 c (10,11)	469,34 (5,84)
Casca de café	642,66 b (10,11)	396,40 c (10,11)	275,72 b (10,11)	438,26 (5,84)
Bagaço de laranja	622,85 b (10,11)	554,65 a (10,11)	496,07 a (10,11)	557,86 (5,84)
Médias (Erro-padrão)	552,34 (4,13)	390,24 (4,13)	249,49 (4,13)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

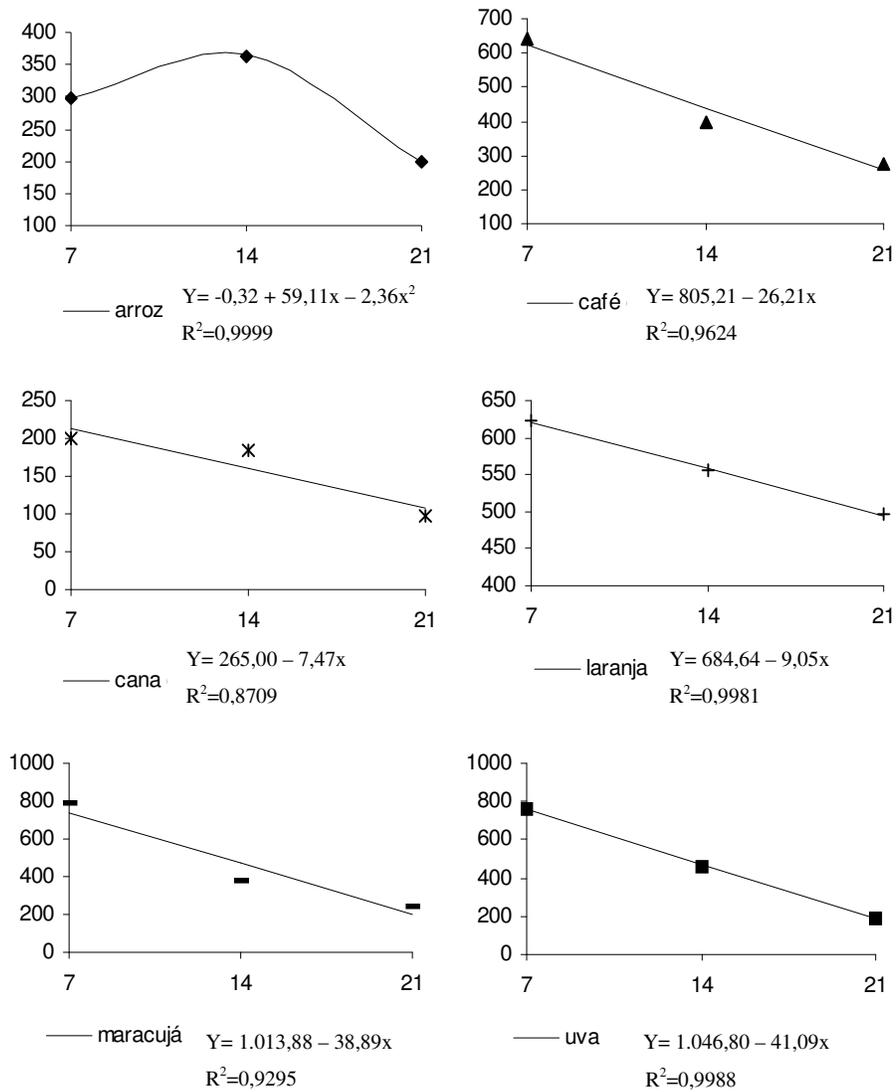


FIGURA 7 – Valores médios de pectina solúvel, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.

O comportamento da pectina solúvel foi variável durante os diferentes tempos de cultivo do agente biológico para cada substrato. A Tabela 7 mostra melhores valores de pectina solúvel em 7 dias para as cascas de maracujá e uva com 784,88 e 764,90 mg/100g respectivamente. Com 14 e 21 dias o bagaço da laranja teve maior quantidade de pectina solúvel com 554,65 e 496,07 mg/100g.

Na Figura 7 observa-se uma ascensão para o arroz no tempo de cultivo de 7 dias até aos 14 dias e uma posterior queda com 21 dias, isso é devido a alta atividade de PG e PME, pois quanto mais pectina solúvel no meio maior atividade enzimática dessas pectinases.

Analisando a Figura relacionada à pectina solúvel, nota-se uma menor variação para o bagaço da laranja e bagaço de cana-de-açúcar, pois os valores de pectina solúvel tiveram uma maior estabilidade durante os três tempos de cultivo. No bagaço da laranja esses valores se correlacionam de forma coerente com as atividades de PG e PME, que, teve aumento na atividade da PG e manteve-se estável na atividade da PME ao longo dos três tempos de cultivo. Para o bagaço de cana-de-açúcar não foi observada essa correlação devido a provável repressão catabólica.

Na casca de café, casca de maracujá e casca de uva os valores de pectina solúvel apresentaram um maior declínio proporcional às maiores quantidades iniciais no tempo de cultivo de 7 dias (Figura 7).

3.3.2 Pectina Total

Os dados referentes à quantificação de pectina total nos diferentes substratos, nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 8 e Figura 8.

TABELA 8 – Valores médios de pectina total, em mg/100g, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	717,32 f (16,30)	472,11 f (16,30)	165,54 f (16,30)	451,65 (9,41)
Casca de uva	1.015,92 e (16,30)	524,52 e (16,30)	247,33 e (16,30)	595,92 (9,41)
Arroz	1.465,71 d (16,30)	751,53 b (16,30)	343,14 d (16,30)	853,46 (9,41)
Casca de maracujá	1.931,90 a (16,30)	631,05 d (16,30)	351,92 c (16,30)	971,63 (9,41)
Casca de café	1.525,09 c (16,30)	1.032,36 a (16,30)	562,63 b (16,30)	1.040,03 (9,41)
Bagaço de laranja	1.865,11 b (16,30)	706,15 c (16,30)	625,78 a (16,30)	1.065,68 (9,41)
Médias (Erro-padrão)	1.420,17 (6,65)	686,29 (6,65)	382,72 (6,65)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

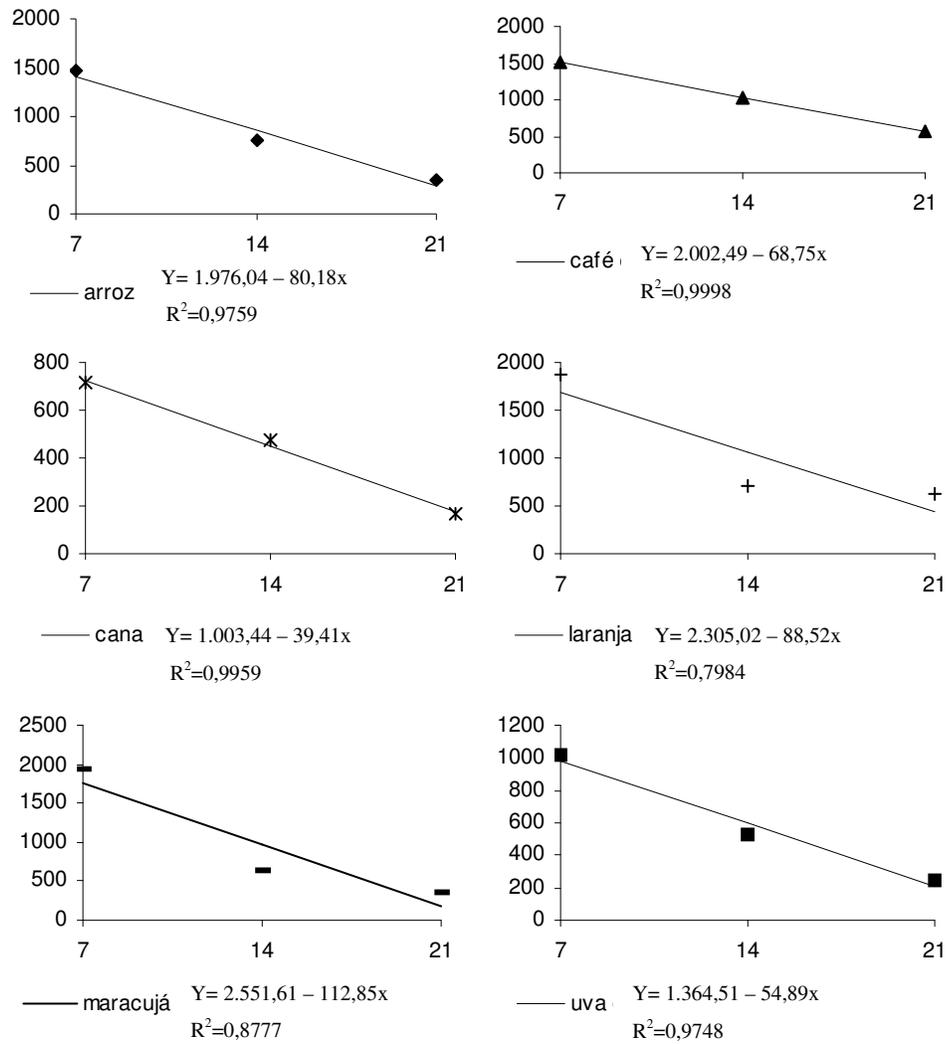


FIGURA 8 – Valores médios de pectina total, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.

Em 7 dias de cultivo todos os substratos apresentaram uma alta quantidade de pectina total (Tabela 8) sendo que, a casca de maracujá foi o substrato com maior quantidade 1525,09mg/100g. O bagaço de cana-de-açúcar teve uma menor quantidade, em relação aos outros, nos três tempos de cultivo (Tabela8). A casca de café teve maior quantidade de pectina solúvel em 14 dias com 706,15mg/100g e o bagaço de laranja em 21 dias com 625,78mg/100g.

Verificou-se um decréscimo acentuado nos níveis de pectina total com o tempo de cultivo do agente biológico em todos os substratos (Figura 8). Um decréscimo na protopectina e pectina total são observados durante o amadurecimento de frutas. A casca de maracujá e bagaço de laranja mostraram um maior teor de pectina total no tempo de 7 dias, enquanto que no período de 14 dias os substratos do café e arroz obtiveram melhores resultados, porém o comportamento do gráfico de pectina total para todos os substratos em função do tempo de cultivo foi diminuir (Figura 8).

A quantidade de pectina total está relacionada com a atividade de PG e PME, sendo que quanto maior a atividade do meio, menor a quantidade de pectina total. Essa diminuição é observada, pois como todos os substratos tiveram atividade das pectinases, PG e PME, conseqüentemente a pectina total diminuiu ao longo do tempo de cultivo.

3.3.3 Solubilidade da pectina

Os dados referentes à solubilidade da pectina nos diferentes substratos, nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 9 e Figura 9.

TABELA 9 – Valores médios de solubilidade de pectina, em porcentagem, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	28,03 (1,93) d	38,90 (1,93) e	58,28 (1,93) c	41,74 (1,11)
Casca de uva	75,28 (1,93) a	87,72 (1,93) a	76,70 (1,93) a	79,90 (1,11)
Arroz	20,32 (1,93) e	48,42 (1,93) d	57,94 (1,93) c	42,23 (1,11)
Casca de maracujá	40,65 (1,93) b	60,71 (1,93) c	68,44 (1,93) b	56,60 (1,11)
Casca de café	42,20 (1,93) b	38,41 (1,93) e	49,03 (1,93) d	43,21 (1,11)
Bagaço de laranja	33,39 (1,93) c	78,52 (1,93) b	79,30 (1,93) a	63,74 (1,11)
Médias (Erro-padrão)	39,98 (0,79)	58,78 (0,79)	64,95 (0,79)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

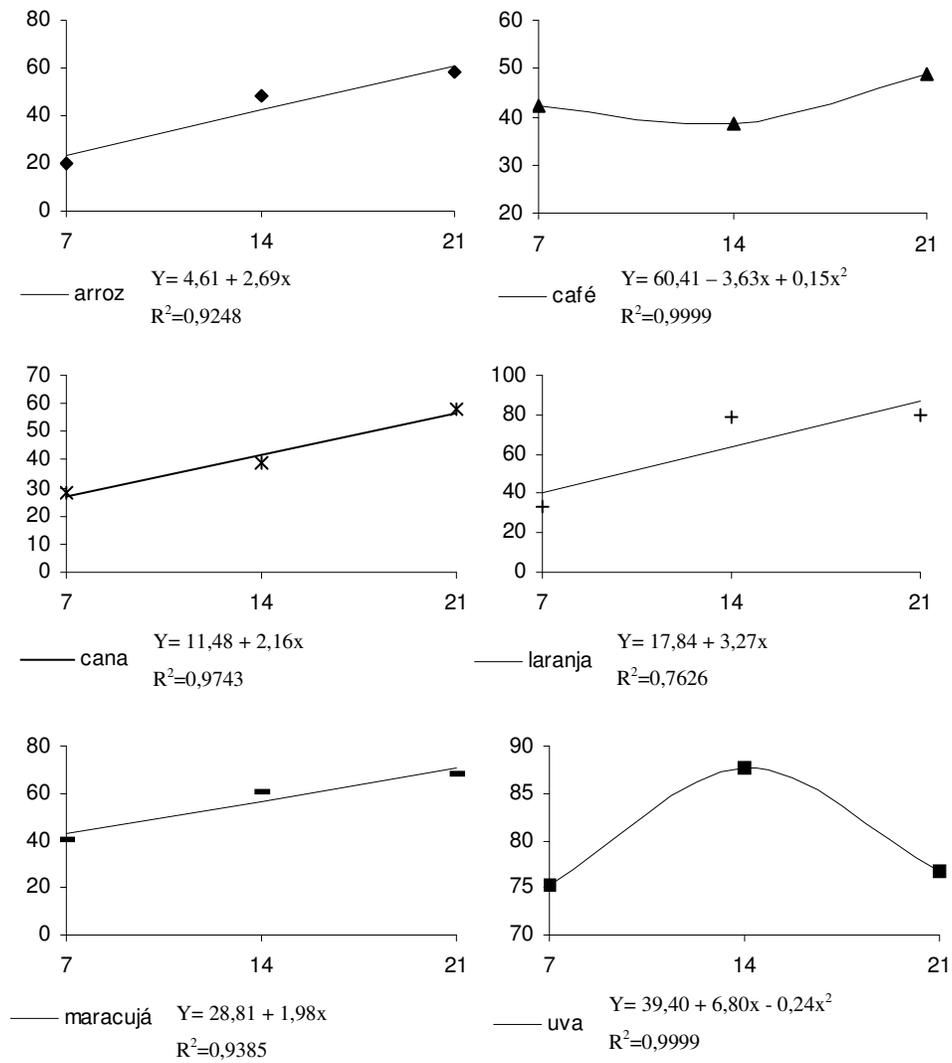


FIGURA 9 – Valores médios de solubilidade de pectina, para cada um dos substratos, em função dos tempos de cultivo do agente biológico.

A casca de uva teve maior e o arroz menor solubilidade da pectina em 7 dias com 75,28% e 20,32% respectivamente. Nos três tempos de cultivo a casca de uva apresentou maior solubilidade (Tabela 9). O bagaço de cana-de-açúcar com 58,28% e o arroz com 57,94% foram os substratos com menor solubilização em 21 dias.

Houve uma tendência de maior solubilização a partir do sétimo dia de cultivo nos diferentes substratos (Figura 9). Aos valores de pectina em relação às atividades de PG e PME, os substratos apresentaram boas quantidades de pectina total o que pode ter induzido as melhores atividades das pectinases com 7 dias de cultivo. As curvas de solubilidade da pectina e atividade da PG da casca de uva tiveram o mesmo padrão de crescimento nos três tempos de cultivo e seu substrato apresentou maior solubilidade e maior atividade de PG e PME em relação aos outros.

A maior solubilização da pectina, nos diferentes substratos, ao longo do tempo de cultivo, indica uma maior atuação das pectinases citadas. As pectinases PG e PME podem ter sido afetadas por outros fatores do meio e por isso, suas atividades não foram iguais nos diferentes substratos e não podem estar diretamente relacionadas com os valores de pectinas apresentados.

3.4 Condições de cultivo dos substratos

A produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular pela composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e temperatura de cultivo, além de outros fatores.

3.4.1 pH

Os dados referentes ao pH dos diferentes substratos, nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 10 e Figura 10.

TABELA 10 – Valores médios de pH em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	6,26 (0,06) c	5,12 (0,06) c	5,66 (0,06) c	5,68 (0,03)
Casca de uva	4,19 (0,06) d	3,76 (0,06) e	3,54 (0,06) e	3,83 (0,03)
Arroz	6,29 (0,06) c	6,44 (0,06) b	6,78 (0,06) b	6,50 (0,03)
Casca de maracujá	8,26 (0,06) a	8,04 (0,06) a	7,93 (0,06) a	8,08 (0,03)
Casca de café	4,30 (0,06) d	4,60 (0,06) d	5,04 (0,06) d	4,65 (0,03)
Bagaço de laranja	8,03 (0,06) b	7,94 (0,06) a	6,83 (0,06) b	7,60 (0,03)
Médias (Erro-padrão)	6,22 (0,03)	5,99 (0,03)	5,97 (0,03)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

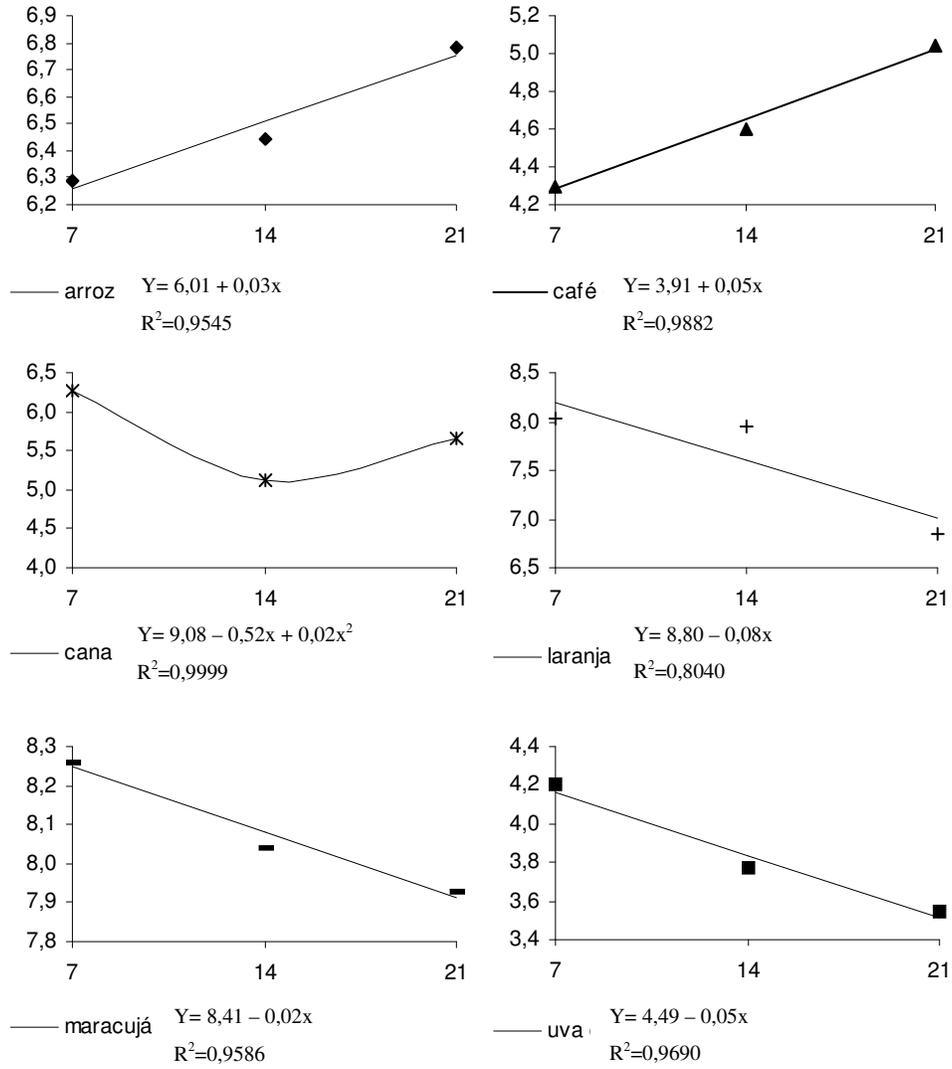


FIGURA 10 – Valores médios de pH, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.

Os valores de pH em 7 dias para a casca de café, 4,30 e casca de uva, 4,19 foram baixos. O bagaço da laranja e casca de maracujá tiveram valores altos de pH neste tempo. Em 14 e 21 dias o pH mais baixo foi da casca de uva (Tabela 10). A casca de maracujá teve os maiores valores de pH de 8,26, 8,04, 7,93 em 7, 14 e 21 dias.

Cada substrato apresentou um valor de pH o que influenciou diferentemente as atividades das pectinases. No bagaço da laranja e casca de uva a diminuição do pH com o tempo de cultivo (Figura 10) pode ter influenciado o aumento da atividade da poligalacturonase. O pH da casca de uva foi próximo da faixa considerada ótima no tempo de 7 dias relacionando-se com suas melhores atividades de PG e PME também neste tempo.

O aumento do pH na casca de café (Figura 10) possivelmente afetou as atividades das pectinases PG e PME, visto que as atividades máximas de pectinases ocorrem em uma faixa de pH de 4,5-5,0. O pH da casca de café estava na faixa ótima de produção enzimática, porém deve ter sofrido alguma repressão catabólica ao longo do tempo de cultivo.

O alto valor do pH na casca de maracujá em média 8,03 nos três tempos de cultivo pode ter afetado negativamente sua atividade da PME. Martin et al. (2004) verificaram atividades ótimas de PG produzidas por *Moniliella sp* e *Penicillium sp* em pH 4,5. Porém as enzimas da *Moniliella sp* foram estáveis em pH 3,0-10,0 na produção da poligalacturonase PG e para o *Penicillium sp* a PG foi estável na faixa de pH de 3,0-8,0.

No trabalho de Silva et al. (2002), na produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* "RFC3" os resultados indicaram que a quantidade máxima desta enzima durante o período de fermentação não foi significativamente influenciada pela temperatura ou pH, mas o perfil de produção desta enzima durante o período de fermentação variou em função do pH inicial do substrato. Martins et al. (2002) produziram poligalacturonase PG

por *T. aurantiacus* “179-5” utilizando fermentação em estado sólido com bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono, a qual mostrou atividade máxima em pH 5,0. Esta foi estável na faixa de pH ácida a neutra por 1 hora. Kaur et al. (2004) mostraram que a poligalacturonase termoestável produzida pelo fungo *S. thermophile apinis*, utilizando fermentação submersa, teve suas condições ótimas de atividade em pH 7,0.

De acordo com Menjivar (1995), a atividade máxima de pectinesterase foi detectada em pH 4,5. Embora encontrada atividade na faixa de 2,0 a 6,5. Os dados do trabalho em relação aos citados indicam que as pectinases foram produzidas com propriedades diferentes.

3.4.2 Umidade

Os dados referentes à umidade nos diferentes substratos e nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 11 e Figura 11.

TABELA 11 – Valores médios de umidade, em porcentagem, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	22,21 (0,17) f	11,76 (0,17) e	9,85 (0,17) d	14,61 (0,10)
Casca de uva	85,40 (0,17) b	83,43 (0,17) b	81,25 (0,17) a	83,36 (0,10)
Arroz	55,54 (0,17) e	54,47 (0,17) d	52,67 (0,17) c	54,23 (0,10)
Casca de maracujá	84,39 (0,17) c	83,11 (0,17) b	81,69 (0,17) a	83,07 (0,10)
Casca de café	80,39 (0,17) d	79,51 (0,17) c	77,33 (0,17) b	79,07 (0,10)
Bagaço de laranja	87,19 (0,17) a	86,32 (0,17) a	81,30 (0,17) a	84,94 (0,10)
Médias (Erro-padrão)	69,19 (0,07)	66,43 (0,07)	64,02 (0,07)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

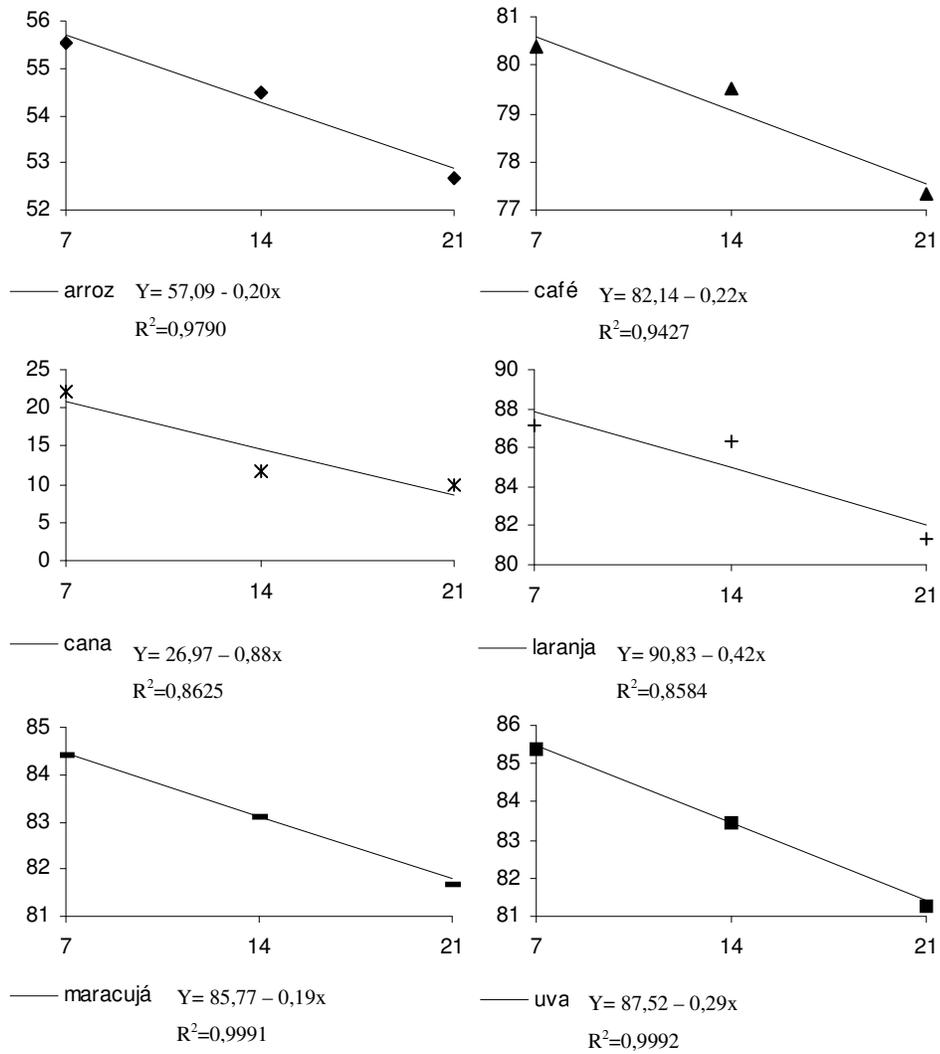


FIGURA 11 – Valores médios de umidade, para cada um dos substratos, em função do tempo de cultivo do agente biológico.

O bagaço da laranja apresentou maior teor de umidade nos três tempos de cultivo enquanto que o bagaço da cana-de-açúcar teve a menor umidade (Tabela 11). Em 14 dias a casca de uva e a casca de maracujá apresentaram teores de umidade próximos com 83,43 e 83,11% respectivamente. A casca de uva, a casca de maracujá e o bagaço da laranja também tiveram valores próximos em 21 dias de cultivo (Tabela 11).

Com o aumento do tempo de cultivo a umidade para todos os substratos diminuiu (Figura 11), isso pode ser devido aos processos metabólicos resultante do desenvolvimento do microrganismo ou às trocas nutricionais do agente biológico com o meio provocando o gasto de energia. Para o crescimento do agente biológico, foram melhores os substratos com o teor de umidade de 55,54 a 87,19%.

Cada substrato apresentou um teor de umidade de acordo com o material utilizado. Do substrato mais úmido até o substrato mais seco todos apresentaram atividade enzimática em 7 dias de cultivo. Contudo a baixa atividade enzimática da PME no substrato da cana-de-açúcar possivelmente está relacionada com a baixa umidade deste substrato nos três tempos de cultivo. Em 21 dias a umidade do bagaço de cana-de-açúcar diminuiu mais, e com isto a atividade da PG pode ter sido afetada também. Comparando os resultados da umidade, no tempo de cultivo de 7 dias, à atividade da poligalacturonase obteve melhores resultados para os substratos com menor umidade.

3.4.3 Acidez titulável (AT)

Os dados referentes à acidez titulável dos diferentes substratos, nos três tempos de cultivo do agente biológico estão representados na Tabela 12 e Figura 12.

TABELA 12 – Valores médios de acidez titulável, em ml de NaOH, em função dos substratos estudados e tempos de cultivo do agente biológico. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substratos	Tempos de cultivo do agente biológico			Médias (Erro-padrão)
	7	14	21	
Bagaço de cana-de-açúcar	0,10 (0,06) b	0,10 (0,06) c	0,10 (0,06) b	0,10 (0,03)
Casca de uva	0,30 (0,06) a	0,70 (0,06) a	1,16 (0,06) a	0,72 (0,03)
Arroz	0,10 (0,06) b	0,10 (0,06) c	0,10 (0,06) b	0,10 (0,03)
Casca de maracujá	0,10 (0,06) b	0,10 (0,06) c	0,13 (0,06) b	0,11 (0,03)
Casca de café	0,30 (0,06) a	0,30 (0,06) b	0,26 (0,06) b	0,28 (0,03)
Bagaço de laranja	0,10 (0,06) b	0,10 (0,06) c	0,10 (0,06) b	0,10 (0,03)
Médias (Erro-padrão)	0,16 (0,02)	0,23 (0,02)	0,31 (0,02)	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

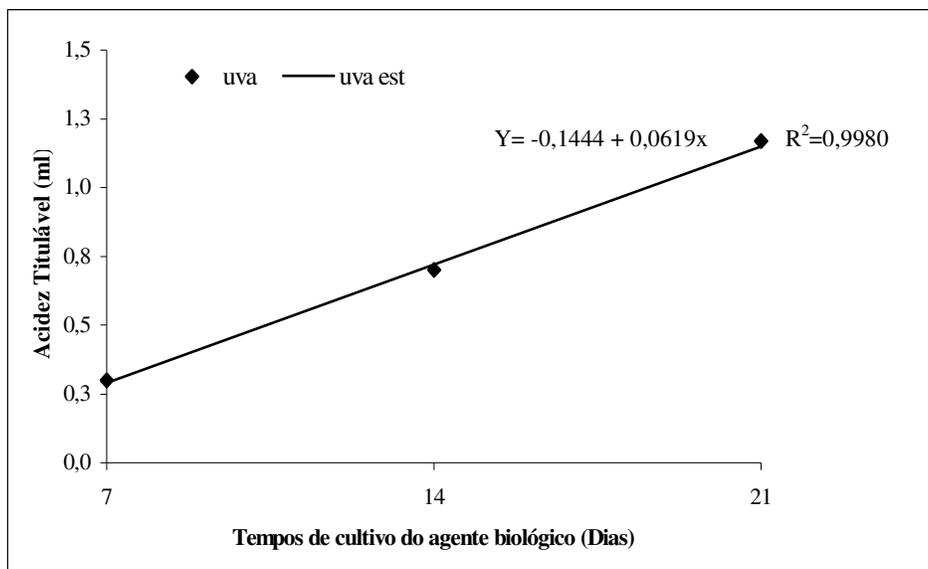


FIGURA 12 – Valores médios de acidez, para o substrato uva, em função dos tempos de cultivo do agente biológico.

O volume gasto de NaOH para a casca de uva e casca de café foram semelhantes (Tabela 12) em 7 dias do tempo de cultivo. Para os substratos bagaço de cana-de-açúcar, arroz, casca de maracujá e bagaço de laranja esse volume foi de 0,10ml de NaOH neste tempo. A casca de uva teve o maior valor em 14 dias com 0,70ml de NaOH e em 21 dias com 1,16ml de NaOH.

Foi observado um comportamento diferente da acidez titulável da casca da uva, apenas para seu substrato houve aumento da acidez com o tempo de cultivo do agente biológico (Figura 12), os outros substratos apresentaram-se constantes, seu valor de acidez titulável. Esse aumento da acidez titulável da casca de uva juntamente com seu valor de pH na faixa ótima pode ter

influenciado a alta atividade da PME deste substrato ao longo do tempo de cultivo.

A comparação dos valores deste trabalho com aqueles reportados para pectinases de outras fontes não é muito significativa porque é muito alta a variabilidade de métodos utilizados entre os laboratórios e também porque as enzimas pectinolíticas diferem uma das outras no que diz respeito ao seu mecanismo de ação.

4 CONCLUSÕES

Sob as condições experimentais em que se realizaram os estudos, pode-se concluir:

- A partir das amostras de material orgânico (substratos) foi possível o crescimento do microrganismo produtor de pectinases.

- Para o agente biológico “G088” foram expressivos os resultados, dos diferentes substratos, na produção de pectinases (PG e PME), com destaque para a casca de uva e arroz.

- As pectinases (PG e PME) apresentaram atividade enzimática sem necessidade de controle do meio, o que sugere que a produção dessas enzimas possa ser um processo economicamente viável e vantajoso do ponto de vista industrial.

- O substrato da casca de uva aos 14 dias foi o melhor substrato para produção de PG e PME.

- A composição do substrato tem influência direta na produção de PG e PME.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse na utilização de substrato sólido para a produção de compostos de importância comercial é uma consequência da demanda por insumos de menor custo. Várias são as vantagens da utilização destes substratos para produção de pectinases: facilidade de manejo e produção, ocupando pouco tempo e espaço; utilização de matérias-primas como cascas, sementes e bagaço, abundantes e baratas; seu crescimento é bastante rápido, permitindo um rápido retorno do investimento.

Os resultados apresentados mostram a capacidade de produção enzimática do agente biológico “G088” por sua alta atividade enzimática em pectinases PG e PME, rápido crescimento em diferentes substratos, facilmente encontrado na natureza, não é tóxico, e é considerado como microrganismo GRAS.

Devido aos bons resultados tanto do agente biológico quanto dos substratos estudados torna-se necessário aprofundar e aperfeiçoar os estudos relacionados a controle das condições de cultivo, viabilidade da adição de pectina, combinação de diferentes substratos e utilização de outros meios de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 15ed. Washington, 1990. 1117 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 12.ed. Washington, 1992. 1015 p.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid caarbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 4, n. 4, p. 330-334, 1962.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 47-503, Dec. 2001.

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

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. **Journal of food Science**, Chicago, v. 43, n. 1, p.264-266, Jan./Feb. 1978.

CROTTI, L. B.; JABOPR, V. A.; CHELLEGATTI, M. A.; FONSECA, M. J. and SAID, S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 39, n. 4, p. 227-235, 1999.

DISHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; RODIS, P.; KAPANTAI, M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 145-148, Oct. 1993.

GEOCZE, M. L. A. **Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1994. 54 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v. 1, 533 p.

ISMAIL, A. S. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 31, n.7, p. 645-650, Sept. 1996.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. P. Pectinolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum L.*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p. 1045-1087, Sept. 1984.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 239-243, Sept. 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid – state fermentation using agro industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 813-819, Apr. 2004.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-954, Apr. 2002.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruit. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

MENJIVAR, M. L. D. de. **Producao de pectinesterase por *Penicillium expansum***. 1995 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NELSON, N. A photometric adaptation os Somogyi method for determination of glicose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 136-175, Jan. 1944.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Separation and characterization the exopolygalacturonase e endopolygalacturonase from peaches. **Plant Physiology**, Rockville, v. 52, n. 3, p. 252-256, Sep. 1973.

RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas, Campinas.

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

SOARES, M. M. C. N.; DA SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potencial application on juice extraction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 79-82, Feb. 2001.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 13, n. 2/3, p. 205-218, Mar. 2003.

TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, JOSÉ, L.; DURAN, N. Efeito das fontes de carbono na produção de pectinase por *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 286-290, out./dez. 2000.

ANEXOS

ANEXO A

		Página
TABELA 1A	Análise de variância para os dados transformados de atividade PG e PME, em nmol/gmin.....	84
TABELA 2A	Análise de variância para pectina total, em mg/100g, pectina solúvel, em g/100g, e solubilidade de pectina, em porcentagem.....	84
TABELA 3A	Análise de variância para pH, umidade, em porcentagem, e acidez titulável, em ml de NaOH.....	85
TABELA 4A	Análise de variância para açúcar, em g/100g, umidade e extrato etéreo, em porcentagem.....	85
TABELA 5A	Análise de variância para fração protéica, fibra bruta e cinzas, em porcentagem.....	86

TABELA 1A – Análise de variância para os dados transformados de atividade PG e PME, em nmol/gmin.

Fonte de variação	Gl	Quadrados Médios (p-valor)	
		Atividade PG	Atividade PME ¹
Substrato (S)	5	1121,86 (<0,0001)	4,5028 (<0,0001)
Tempo (T)	2	2856,71 (<0,0001)	5,2588 (<0,0001)
S x T	10	1994,90 (<0,0001)	0,9846 (<0,0001)
Erro	36	0,46	0,0017
CV (%)		1,02	1,84

¹ dados transformados por $\log_{10}(y+1)$.

TABELA 2A – Análise de variância para pectina total, em mg/100g, pectina solúvel, em g/100g, e solubilidade de pectina, em porcentagem.

Fonte de variação	gl	Quadrados Médios (p-valor)		
		Pectina total	Pectina solúvel	Solubilidade Pectina
Substrato (S)	5	572.767,29 (<0,0001)	191.634,43 (<0,0001)	2.116,62 (<0,0001)
Tempo (T)	2	5.121.147,66 (<0,0001)	413.406,84 (<0,0001)	3.045,16 (<0,0001)
S x T	10	160.413,86 (<0,0001)	44.317,06 (<0,0001)	344,57 (<0,0001)
Erro	36	796,94	306,81	11,19
CV (%)		3,40	4,41	6,13

TABELA 3A – Análise de variância para pH, umidade, em porcentagem, e acidez titulável, em ml de NaOH.

Fonte de variação	gl	Quadrados Médios (p-valor)		
		pH	Umidade	Acidez
Substrato (S)	5	24,7558 (<0,0001)	7.020,2570 (<0,0001)	0,5585 (<0,0001)
Tempo (T)	2	0,3727 (<0,0001)	120,5281 (<0,0001)	0,0940 (0,0004)
S x T	10	0,5932 (<0,0001)	14,9573 (<0,0001)	0,0945 (<0,0001)
Erro	36	0,0114	0,0889	0,0094
CV (%)		1,77	4,41	41,00

TABELA 4A – Análise de variância para açúcar, em g/100g, umidade e extrato etéreo, em porcentagem.

Fonte de variação	gl	Quadrados Médios (p-valor)		
		Açúcar	Umidade	Etrato etéreo
Substrato (S)	5	566,2103 (<0,0001)	1951,7118 (<0,0001)	4,4934 (<0,0001)
Erro	12	1,5794	0,0790	0,0076
CV (%)		9,12	0,39	4,80

TABELA 5A – Análise de variância para fração protéica, fibra bruta e cinzas, em porcentagem.

Fonte de variação	gl	Quadrados Médios (p-valor)		
		Fração protéica	Fibra bruta	Cinzas
Substrato (S)	5	54,7377 (<0,0001)	571,1243 (<0,0001)	24,5315 (<0,0001)
Erro	12	0,0797	0,3513	0,0756
CV (%)		3,52	2,70	7,77