



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA CAROLINA OLIVEIRA

**Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando
resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica L.*)**

Itapetinga

2013

ANA CAROLINA OLIVEIRA

**Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando
resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica L.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:
Profa. *D.Sc.* Marcelo Franco

Co-orientadores:
Profa. *D.Sc.* Andréa Gomes da Silva

Itapetinga

2013

660.634 O45e	<p>Oliveira, Ana Carolina.</p> <p>Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (<i>Mangífera índica L.</i>). / Ana Carolina Oliveira. - Itapetinga: UESB, 2013. 60f.</p> <p>Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e co-orientação da Profa. D.Sc. Andréa Gomes da Silva.</p> <p>1. Enzimas pectinases – Resíduos agroindustriais de manga – Produção. 2. Enzimas pectinases - Fermentação em estado sólido - Produção. 3. <i>Aspergillus niger</i>. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Franco, Marcelo. III. Silva, Andréa Gomes da. IV. Título.</p> <p style="text-align: center;">CDD(21): 660.634</p>
-----------------	---

Catlogação na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Enzimas pectinases – Resíduos agroindustriais de manga – Produção
2. Enzimas pectinases - Fermentação em estado sólido - Produção
3. *Aspergillus niger*



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESPÍDUO AGROINDUSTRIAL DE MANGA (*Mangífera indica* L).”

Autor: ANA CAROLINA OLIVEIRA

Orientador: Prof. MARCELO FRANCO, DSc., UESC

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof. Marcelo Franco, DSc., UESC


Profª. Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB


Profª. Flávia Mariani Barros, DSc., UESB

Data da Realização: 22 de Fevereiro de 2013.

Praça Primavera, Nº 40, Bairro Primavera – Telefone: (77) 3261-8629 - Fax: (77) 3261-8701
Itapetinga – BA CEP: 45.700-000 – e-mail: ppgeal.uesb@yahoo.com.br

Dedico aos meus pais Edgar e Beatriz que dedicaram e dedicam suas vidas a minha, sendo eternamente grata, a Emanuel pelo companheirismo e a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Em especial aos meus pais Edgar e Beatriz, sempre presentes na minha vida.

À Emanuel, meu namorado e grande companheiro de todos os momentos.

Ao professor Marcelo Franco, pela orientação, pelo incentivo, confiança e amizade.

À toda equipe do LABRA que me ajudaram nas análises, em especial a Adriana que me ajudou no início do meu trabalho e a Ismaicon meu fiel ajudante. A todos pelos momentos de descontração e pela amizade, Thiago, Aleksandra, Clissiane, Gleydison, Grazielle, Zanon, Júlia e Devson. À professora Kátia Iro pelo apoio e amizade.

As minhas amigas e companheiras para todas as horas Graziella, Jamilly, Tamires, Gleiza e Ingrid.

Aos meus vizinhos e amigos Wilian e Thiara por todo apoio e as noites em claro. Aos meus queridos amigos Hévila e Esdras pelo apoio e amizade.

À todos os meus professores do mestrado, bem como aos secretários da pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB pela bolsa concedida.

À UESB e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade.

Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica L.*)

RESUMO

A produção de enzimas por microrganismos é influenciada pelas características nutricionais do meio, e também pelas condições de cultivo, como umidade, tempo e temperatura, além de outros fatores. Este trabalho teve como objetivos principais a caracterização do resíduo de manga (*Mangífera indica L.*) avaliando sua viabilidade como substrato na fermentação em estado sólido (FES) para produção da enzima poligalacturonase (PG); a otimização da enzima (PG) por *Aspergillus niger* (*A.niger*) em fermentação em estado sólido (FES) utilizando o resíduo de manga como substrato, avaliando a influência dos parâmetros umidade (30, 40, e 50%), tempo (24, 48 e 72 horas) e de temperatura (25, 30 e 35°C) para produção da poligalacturonase, utilizando para esse fim a metodologia de superfície de resposta em um planejamento fatorial com a finalidade de determinar as melhores faixas das condições do processo de fermentação em estado sólido; e o estudo da estabilidade térmica (20, 40, 60, 80 e 100°C) e estabilidade ao pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) da enzima produzida obtido após o processo fermentativo. A caracterização do resíduo seco mostrou que este substrato pode ser considerado viável para produção de poligalacturonase apresentando bons níveis de pectina, 9,62% e proteína 6,73%. A utilização da análise de superfície de resposta permitiu observar que as umidades (30, 40 e 50%) estudados não tiveram influência na produção enzimática. A máxima produção (processo otimizado) de poligalacturonase, com atividade de 7,66 U/g, foi obtida em 43 horas de fermentação na temperatura de 28,78°C. Quanto ao estudo de estabilidade da poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto, esta mostrou boa estabilidade até em temperaturas altas. Com de resultado 74% da atividade relativa na temperatura de 80°C no tempo de 130 minutos Em temperaturas acima de 100°C ainda pode ser detectada. Quanto ao estudo de estabilidade em relação às variações de pH, a enzima não apresentou boa estabilidade em relação aos tempos nos valores de pH entre 3 e 8. Mas apresentou 157% de atividade relativa em pH 3. Apresentando atividade em todas as faixas estudadas.

Palavras-chave: Resíduos, Pectinases, *Aspergillus Niger*.

Study of polygalacturonase production by solid state fermentation using mango agri-business residue (*Mangifera indica L.*)

ABSTRACT

The enzyme production by microorganisms is influenced by the nutritional characteristics of the medium, and also by growing conditions, such as humidity, temperature and time, and other factors. This study aimed to characterize the main residue of mango (*Mangifera indica L.*) assessing its viability as substrate in solid state fermentation (SSF) for the production of the enzyme polygalacturonase (PG) enzyme optimization (PG) by *Aspergillus niger* (*A.niger*) in solid state fermentation (SSF) the residue of mango as substrate, evaluating the influence of parameters moisture (30, 40, and 50%), length (24, 48 and 72 hours) and temperature (25, 30 and 35 ° C) to produce polygalacturonase, using for this purpose the response surface methodology on an experimental design in order to determine optimal ranges of process conditions for solid-state fermentation, and the stability study Thermal (20, 40, 60, 80 and 100 ° C) and pH stability (3, 4, 5, 6, 7 and 8) produced the enzyme obtained after the fermentation process. The characterization of the dry residue showed that this substrate can be considered viable for production of polygalacturonase showing good levels of pectin, 9.62% and 6.73% protein. The use of response surface analysis allowed us to observe that humidity (30, 40 and 50%) studied had no effect on enzyme production. The maximum yield (optimized process) of polygalacturonase activity with 7.66 U / g was obtained in 43 hours of fermentation at temperature of 28.78 ° C. As for the stability study of polygalacturonase produced in crude enzyme extract, it showed good stability even at high temperatures. As a result 74% of relative activity at 80°C at time 130 minutes and at temperatures above 100 ° C can still be detected. As for the study of stability in relation to changes in pH, the enzyme not present good stability in relation to the times at pH values between 3 and 8. But had 157% relative activity at pH 3. Introducing activity in all age groups.

Keywords: Waste, Pectinases, *Aspergillus Niger*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Composição da parede vegetal, contendo moléculas de pectina.....	16
Figura 2 -	Fragmento de uma molécula de pectina.....	17
Figura 3 -	Pontos de ataque das pectinases na molécula de pectina.....	18
Figura 4 -	Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina.....	19
Figura 5 -	Fluxograma da FES.....	31
Figura 6 -	Resíduo de manga após secagem e moagem.....	32
Figura 7 -	<i>Aspergillus niger</i> a 35°C.....	36
Figura 8 -	Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis tempo, temperatura e umidade de fermentação sobre a atividade da poligalacturonase.....	46
Figura 9 -	Superfície de Resposta do modelo ajustado.....	47
Figura 10 -	Estabilidade térmica da enzima poligalacturonase.....	48
Figura 11 -	Estabilidade ao pH da enzima poligalacturonase.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das enzimas pécnicas.....	19
Tabela 2 -	Funções das pectinases na indústria de bebidas e alimentos.....	22
Tabela 3 -	Listagem de reagentes.....	30
Tabela 4 -	Listagem de equipamentos utilizados.....	30
Tabela 5 -	Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo.....	39
Tabela 6 -	Caracterização do resíduo de manga.....	41
Tabela 7 -	Análise de Variância.....	45

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Substâncias pécticas.....	16
2.2. Enzimas pectinolíticas ou pectinases.....	17
2.2.1. Pectina esterase.....	20
2.2.2. Enzimas despolimerizantes.....	20
2.2.2.1. Hidrolases.....	20
2.2.2.2. Liases.....	21
2.2.3. Protopectinases.....	21
2.3. Aplicação das pectinases em alimentos.....	21
2.4. Fermentação em estado sólido na produção de pectinase.....	23
2.4.1. Fatores que influenciam na fermentação.....	24
2.4.1.1. Tamanho do substrato.....	24
2.4.1.2. Temperatura.....	25
2.4.1.3. pH.....	25
2.4.1.4. Aeração.....	25
2.4.1.5. Umidade e atividade de água.....	26
2.4.2. Microrganismo produtor de pectinase.....	27
2.4.3. Substrato.....	28
2.4.4. Estabilidade de enzimas.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Materiais e equipamentos.....	30
3.2. Fluxograma de trabalho.....	31
3.3. Meio de cultivo.....	31
3.4. Caracterização do resíduo.....	32
3.4.1. Densidade aparente.....	32
3.4.2. Densidade real.....	32
3.4.3. Porosidade.....	32
3.4.4. pH.....	33
3.4.5. Umidade.....	33
3.4.6. Medida de atividade de água (Aa).....	33
3.4.7. Cinzas.....	33
3.4.8. Análise de proteínas totais (proteína bruta).....	33
3.4.9. Teor de sólidos solúveis (°Brix)	33
3.4.10. Açúcares Redutores.....	34
3.4.11. Pectinas.....	34
3.4.12. Determinação dos compostos fibrosos (Celulose, Hemecelulose e Lignina)	35
3.5. Microrganismo.....	35
3.6. Preparo do inóculo (solução de esporos).....	36
3.7. Fermentação em estado sólido para otimização da produção da poligalacturonase	36
3.8. Extração da Enzima.....	36
3.9. Quantificação da atividade de Poligalacturonase.....	37
3.10. Determinação da termoestabilidade	38

3.11. Determinação da estabilidade ao pH	38
3.12. Planejamento experimental para otimização da produção da poligalacturonase.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Caracterização do substrato.....	41
4.2. Otimização da produção da poligalacturonase.....	45
4.3. Estabilidade.....	48
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são amplamente utilizadas nos mais diversos processos industriais, em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (BRAVO *et al.*, 2000).

A adição de enzimas pectinolíticas nas polpas de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos conferindo uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (SANTOS, 2007).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes nas células vegetais (MARTIN *et al.*, 2007). São produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos, por algumas bactérias e por poucas leveduras. Das preparações enzimáticas que se encontram no mercado, cerca de 75% do total, contêm normalmente as principais enzimas hidrolíticas, como poligalacturonase, celulase e hemicelulase (COURI *et al.*, 2000). Nas últimas décadas, o uso de pectinases tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil, papel e celulose (BHAT, 2000). Por volta de 1930 as pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas (KASHYAP *et al.*, 2001). Segundo, JAYANI *et al.*, 2005 correspondem a 25% do valor global de enzimas alimentícias comercializadas.

A classificação destas enzimas está baseada nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos, pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina) (UENOJO, 2003; KASHYAP *et al.*, 2001).

Um grande número de microrganismos produz enzimas pectinolíticas. A produção de pectinases em larga escala é feita basicamente por fungos, particularmente do gênero *Aspergillus*.

Segundo Zheng & Shetty (2000), a poligalacturonase é a enzima com função hidrolítica principal. Para maioria dos usos industriais, as poligalacturonase produzidas por fungos, como *Aspergillus*, provam ser útil pela alta atividade e atividade ótima em faixa de pH baixa,

servindo para grande parte das aplicações em processos com frutas e vegetais (SANTOS, 2007).

O processo de fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários produtos como enzimas (CASTILHO, 1997). O termo fermentação em estado sólido refere-se à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou solução umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células, e por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DELBIANCHI *et al.*, 2001).

Na FES podem ser destacadas algumas características: alta produtividade, alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia. Por outro lado, apresentam dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba favorecendo o uso de fungos filamentosos no processo, devido os mesmo se adaptarem bem a essa condição (PANDEY *et al.*, 1999).

Os principais fatores que afetam a síntese microbiana de enzimas em um sistema de FES incluem: seleção de um substrato satisfatório e microrganismo; pré-tratamento do substrato; tamanho de partícula (espaço inter-partícula e área superficial) do substrato; umidade e atividade de água (Aa) do substrato; temperatura da fermentação; período de cultivo; manutenção de uniformidade no ambiente do sistema em FES, taxa de consumo de oxigênio (PANDEY *et al.*, 1999).

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo geral demonstrar a viabilidade tecnológica para a utilização de um subproduto da fruticultura em bioprocessos, para a produção de biomoléculas (enzimas). Visando a otimização da produção da enzima poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger* como agente de fermentação e utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica L*) como substrato. Para que o objetivo principal fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

- Caracterização do resíduo de manga (*Mangífera indica L.*) avaliando sua viabilidade como substrato para utilização na fermentação em estado sólido para produção da enzima.
- Avaliar a influência as variáveis: umidade, tempo e temperatura sobre a otimização da produção da poligalacturonase, utilizando a metodologia de superfície de resposta em um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, com a finalidade de determinar as melhores faixas das condições do processo de fermentação em estado sólido;
- Estudo da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH da poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto obtido após o processo fermentativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são carboidratos poliméricos, componentes mais complexos e em maior quantidade presentes na parede celular primária e espaços intracelulares de plantas superiores (MOHAMED et al., 2006), estando interligadas a outros polissacarídeos estruturais, como a celulose e a hemicelulose (Figura 1) (SANTOS, 2007). São um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação. Conferem rigidez e proteção à célula vegetal sem interferir na permeabilidade da membrana. É responsável pela manutenção da turgidez do tecido vegetal (KOBELITZ, 2010).

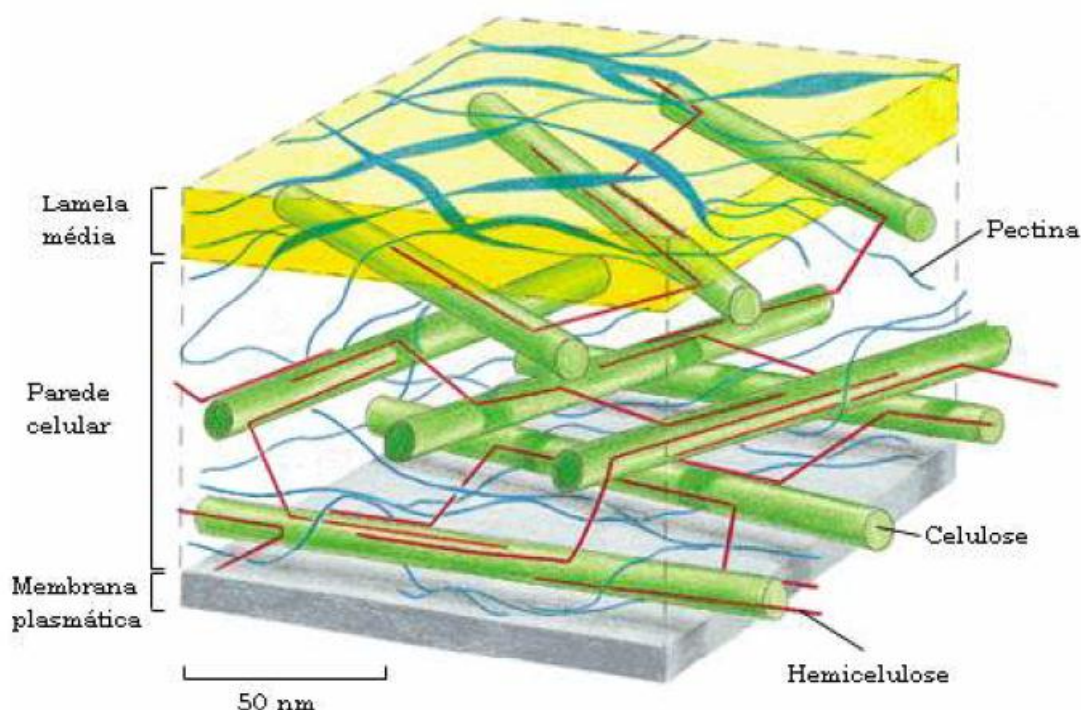


Figura 1: Composição da parede vegetal, contendo moléculas de pectina. (Fonte: Martins, 2006).

Quimicamente é um complexo coloidal de polissacarídeos, composto de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil. A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécticas em quatro tipos principais: protopectina, pectina, ácido péctinico e ácido péctico (SOUZA, 2010).

A protopectina consiste em cadeias de ácidos galacturônicos metoxilados (esterificados com metanol) ligadas entre si por íons metálicos divalentes (Ca^{++} ; Mg^{++}), por cadeias de outros carboidratos, por ácido fosfórico além de pontes de hidrogênios. A protopectina é insolúvel em água e responsável pela textura firme dos frutos verdes. A pectina é o termo geral para substâncias pécticas capazes de formar géis em meio ácido e na presença de açúcar. Contêm 75% ou mais de ácidos galacturônicos esterificados com metanol (Figura 2). O ácido péctico é um grupo de substâncias formadas basicamente por ácidos galacturônicos, contendo quantidades negligenciáveis de metoxilas. E o ácido péctinico é um grupo de substâncias, incluindo a pectina, que contém mais que um número negligenciável de unidades de ácido galacturônico metoxilado em sua estrutura (KOBBLITZ, 2010).

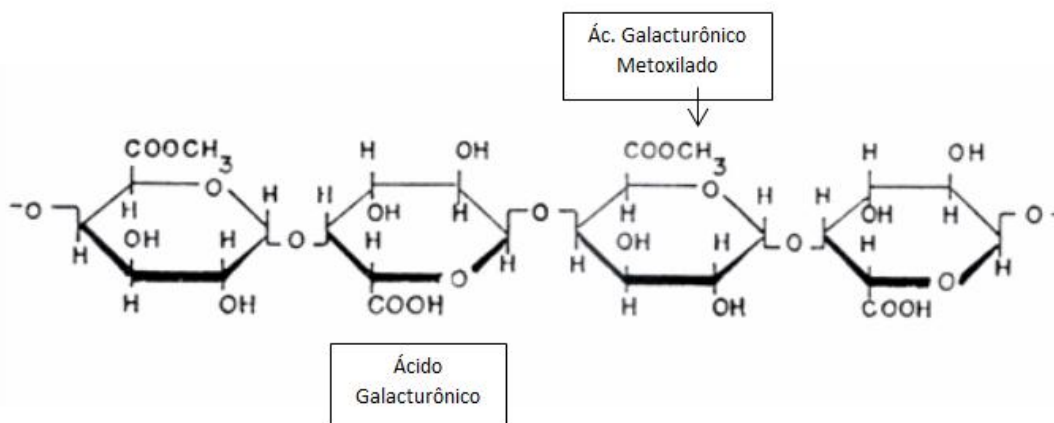


Figura 2: Fragmento de uma molécula de pectina. (Fonte: COURI, 1993)

As pectinas contribuem para a resistência mecânica da parede celular, elas são determinantes para a textura de frutos e vegetais em geral, e durante o seu processamento (BRANDÃO & ANDRADE, 1999). As pectinas têm especial influência sobre o comportamento reológico de sucos, envolvendo problemas relativos ao seu escoamento, importantes para a adequação de sistemas de tubulação, trocadores de calor, filtros, bombas etc. (QUEIROZ et al., 2000). As pectinas são naturalmente degradadas por enzimas pectinolíticas (MOHAMED et al., 2006).

2.2. Enzimas pectinolíticas ou pectinases

Pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4, entre unidades de ácidos galacturônicos ou seu derivado metoxilado. São produzidas por vegetais e microrganismos e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da

parede primária de células vegetais. Em virtude disso as pectinases podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças. Sua aplicação na indústria de alimentos pode trazer uma série de benefícios à obtenção de produtos de origem vegetal (KOBELITZ, 2010).

A classificação das enzimas pécnicas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico (Figura 3), pela preferência de substrato (pectina, ácido pécico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquídificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante). Existem basicamente três tipos de pectinases (Figura 4): pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster (MALVESSI & SILVEIRA, 2004); as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécnicas; e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina. Estas enzimas foram classificadas e nomeclaturados de acordo com a “Enzyme comissão” (EC) (Tabela 1), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (UENOJO & PASTORE, 2007).

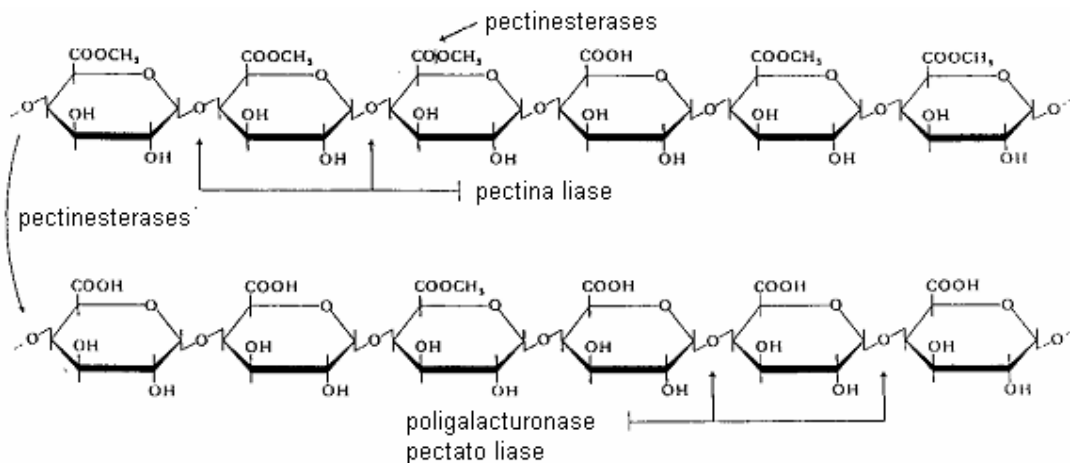


Figura 3: Pontos de ataque das pectinases na molécula de pectina. (Fonte: SANTOS, 2007).

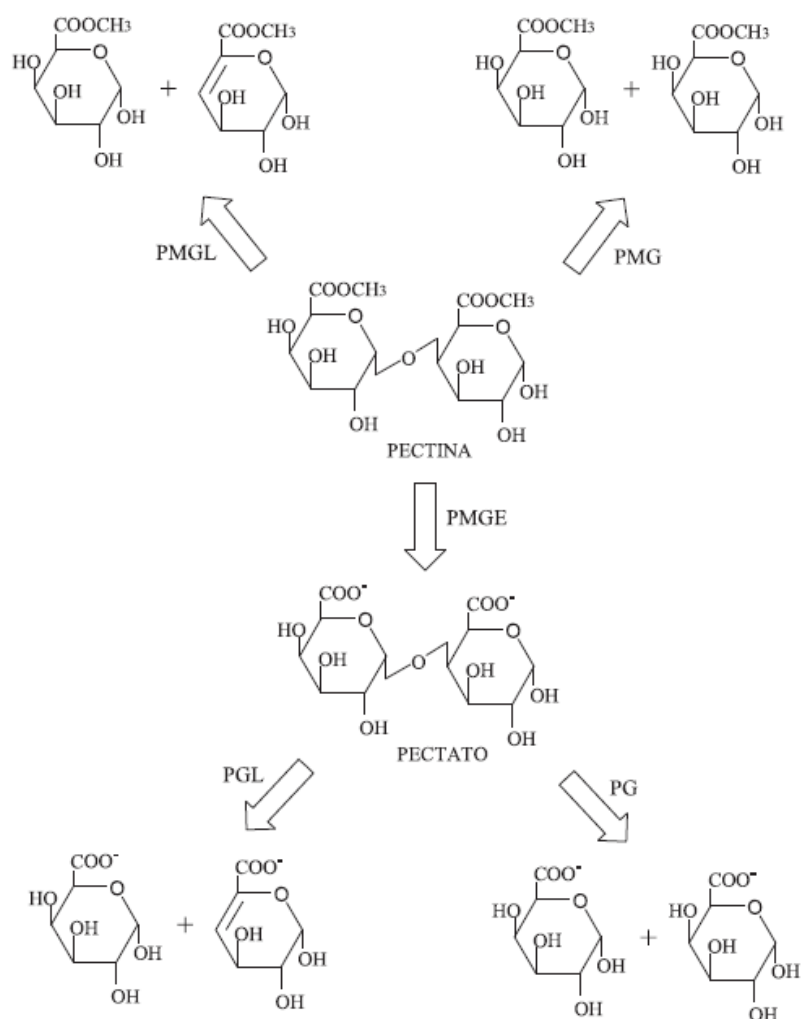


Figura 4: Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase. PMG: polimetilgalacturonase. PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase). PGL: poligalacturonato liase (pectato liase). PG: poligalacturonase. (Fonte: SOUZA, 2008).

Tabela 1: Classificação das enzimas pécticas. (Fonte: UENOJO & PASTORE, 2007).

Tipo de pectinase	Nome sugerido pela EC	Sigla	Nome comum	Número EC
Desesterificante	polimetilgalacturonase esterase	PMGE	pectina esterase	3.1.1.11
Hidrolase	endo poligalacturonase	endo-PG	poligalacturonase	3.2.1.15
	exo poligalacturonase 1	exo-PG 1	poligalacturonase	3.2.1.67
	exo poligalacturonase 2		pectina hidrolase	3.2.1.82
	endo	exo-PG	pectina hidrolase	

		polimetilgalacturonase	2		
		exo polimetilgalacturonase	endo- PMG		
Liase	endo	poligalacturonase	endo- PMG	pectato liase	4.2.2.2
	liase		PGL	pectato liase	4.2.2.9
		exo poligalacturonase liase	exo-PGL	pectina liase	4.2.2.10
	endo	polimetilgalacturonato	endo- PMGL	pectina liase	
	liase				
	exo	polimetilgalacturonato	exo- PMGL		
	liase				

2.2.1. Pectina esterase

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado). Age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada, apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50°C. Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas.

2.2.2. Enzimas despolimerizantes

As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo- (randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido pécico ou pectina como substrato. Envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as liases (catalisam a β -eliminação).

2.2.2.1. Hidrolases

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. A polimetilgalacturonase (PMG) presumivelmente hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de ligações α -1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG. As

poligalacturonases (PG) hidrolisam α -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico. É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial) do ácido pécico. As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50°C.

2.2.2.2. Liases

As liases rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado, e incluem as pectina liases (polimetilgalacturnato liase, PMGL) e as pectato liases (poligalacturonato liase, PGL).

2.2.3. Protopectinases

Estas enzimas solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada. Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares. Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina (UENOJO & PASTORE, 2007).

2.3. Aplicação das pectinases em alimentos

As pectinases foram umas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas em torno de 1930 e somente a partir de 1960, quando os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais se tornaram mais aparentes, é que os cientistas começaram a utilizar as enzimas mais eficientemente (UENOJO & PASTORE, 2007).

O interesse em se utilizar as pectinases tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos (GUMMADI & PANDA, 2003). Diversas companhias na Europa, Estados Unidos e no Japão produzem pectinases. Atualmente, essas enzimas correspondem a cerca de 25% do mercado mundial de enzimas. O valor estimado de vendas em 1995 foi de US\$ 1 bilhão, dos quais US\$ 75 milhões somente com pectinases. Em

2005, o valor de vendas esperado para a indústria de enzimas era de US\$ 1,7 a 2 bilhões (UENOJO & PASTORE, 2007).

As substâncias pécnicas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos das frutas, e sua presença causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração. As enzimas pectolíticas desempenham um papel vital no processamento de alimentos, ajudam a reduzir a viscosidade da polpa, o que por sua vez ajuda na filtração e clarificação de sucos (PANDA et al., 1999). Na maceração de vegetais e frutas para facilitar a extração de óleos essenciais, a aplicação de pectinases hidrolisa os complexos de pectina-proteína, liberando o óleo, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final. E na produção de alimentos para bebês (MALVESSI & SILVEIRA, 2004).

Nas indústrias de vinhos as pectinases, em conjunto com outras enzimas, melhoram a maceração da casca aumentando a extração de pigmentos, facilitando a clarificação e a filtração do mosto, aumentando a qualidade e a estabilidade do vinho (UENOJO & PASTORE, 2007). Uma vez que as enzimas pectolíticas possuem amplas aplicações no processamento de alimentos e bebidas indústrias, a produção destas enzimas se tornou significativa (PANDA et al., 1999).

No Tabela 2 estão apresentadas com mais detalhes algumas funções das pectinases na indústria de bebidas e alimentos.

Tabela 2: Funções das pectinases na indústria de bebidas e alimentos. (Fonte: Souza, 2008).

Enzima	Função	Aplicação
Enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas).	Hidrólise de pectina e de componentes de paredes celulares, diminuição de viscosidade e manutenção de textura de sucos de frutas.	Melhoramento na extração de sucos de frutas e óleo de oliva.
Poligalacturonase, pectina	Hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados.	Clarificação de sucos de frutas

transeliminase e hemicelulase.

Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase.	Processamento de frutas.	Produção de ketchup de alta qualidade e de polpa de frutas.
Pectina esterase.	Desesterificação.	Melhoramento na clarificação da cidra.
Enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas).	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais.	Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor de uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação de vinhos.

2.4. Fermentação em estado sólido na produção de pectinase

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre e é definida como qualquer processo de fermentação realizada sobre um material não solúvel, ou sólido natural, que atua tanto como suporte físico, quanto fonte de nutrientes, atuando como substrato. O baixo teor de umidade significa que a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de microrganismos, principalmente leveduras e fungos, embora algumas bactérias também possam ser utilizadas (COUTO & SANROMÁN, 2006).

O teor de umidade do substrato deve variar entre 12% até cerca de 80%. Abaixo do limite mínimo, os microrganismos não se desenvolvem. O limite superior é fixado em função da capacidade de absorção de água pelo material empregado (SANTOS, 2007).

Embora a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido às indústrias

farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de biorremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, enriquecimento protéico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais, enzimas e variações dos tradicionais alimentos fermentados. De uma forma geral, a aplicação comercial dos processos de FES podem ser divididos em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustrias; 2) aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados (Palma, 2003).

2.4.1. Fatores que influenciam na fermentação

As condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. Na fermentação em estado sólido o controle das condições ambientais se torna mais difícil devido à heterogeneidade da suspensão de células microbianas e da solução de nutrientes e produtos na fase sólida. O baixo conteúdo de umidade na FES possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato, o que simplifica a separação do produto. No entanto, existem sérios problemas com respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, formação de gradientes de pH, nutrientes e produtos como consequência da heterogeneidade do sistema (SANTOS, 2007).

2.4.1.1. Tamanho do substrato

O tamanho da partícula e forma é extremamente importante. Afetam a relação área superficial e o volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas (MITCHELL et al., 2000). Geralmente, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana, podendo resultar em pouco crescimento. Ao contrário, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, mas limitam a superfície para ataque microbiano (PANDEY et al., 1999). Segundo MITCHELL et al. (2000) o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho menores que 1 mm a 1 cm tem sido frequentemente usadas em FES (SOUZA, 2008).

2.4.1.2. Temperatura

Os processos fermentativos caracterizam-se por serem exotérmicos. Durante a FES grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do microrganismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO, 2003).

2.4.1.3. pH

Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro, durante as FES, não é fácil de ser realizado (Pandey, 2003).

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 5,0), afetando o metabolismo dos microrganismos por alterar seu conjunto enzimático. O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do microrganismo. Quando ácidos orgânicos são secretados, como ácidos acético ou láctico, causam o decréscimo do pH. Entretanto, o consumo destes ácidos quando presente no meio causa o aumento do pH (SANTOS, 2007).

Segundo CASTILHO (1997) os valores de pH ótimo de algumas enzimas de *Aspergillus niger* são bastante baixos (pH igual a 4) o que viabiliza seu largo emprego no processamento de frutas.

2.4.1.4. Aeração

Os sistemas de fermentação em estado sólido têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como não existe água livre no meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais. A transferência de oxigênio acontece, fundamentalmente, em duas instâncias: transferência interpartículas e transferência intrapartículas. A maioria dos cultivos em estado sólido permite o livre acesso do oxigênio atmosférico ao substrato, já que o oxigênio é capaz de se difundir, com rapidez, pelo filme líquido superficial formado nas partículas do substrato.

A passagem de ar através do leito permite elevadas taxas de crescimento e produtividade, mas, pode levar ao desenvolvimento do fenômeno de secagem que faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos sejam lentas ou nulas. Para controlar ou minimizar este problema, o ar deve ser saturado em vapor de água ou próximo da saturação. A taxa de aeração ótima nos processos de FES é determinada pela natureza do microrganismo usado, do requerimento particular de oxigênio para o crescimento e síntese de produtos, da quantidade de calor metabólico gerado, do grau de CO₂ e outros metabólitos voláteis que devem ser eliminados, da espessura e densidade aparente do meio e da umidade (SANTOS, 2007). O desenvolvimento microbiano requer um grande consumo de oxigênio, logo a passagem de ar através do meio permite elevadas taxas de crescimento e produtividade (PINTO et al., 2006).

2.4.1.5. Umidade e atividade de água

De todos os parâmetros em um processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na fermentação em estado sólido (FES), devido ao grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. Na FES, a água está relacionada a dois parâmetros. O primeiro, a umidade, que diz respeito à porcentagem de água na massa total de meio. O segundo, a atividade de água (Aa), definida de acordo com a Equação 1, que está relaciona a quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato para o microrganismo. A atividade de água afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2006). A atividade de água exerce papel de maior importância para a atividade fisiológica microbiana do que aquele exercido pelo teor de umidade do meio (CORREIA, 2004).

$$Aa = \frac{UR\%}{100} = \frac{P_a}{P_{a_0}} \quad (1)$$

Onde:

UR% = umidade relativa de equilíbrio

P_a = pressão de vapor de água do substrato

P_{a0} = pressão de vapor da água pura

Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Baixos níveis de umidade levam a um crescimento baixo em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (SANTOS, 2007).

A umidade nos processos de FES geralmente varia entre 30 e 85%. A umidade ótima para o cultivo do microrganismo em FES é dependente da capacidade do substrato em reter água. Por exemplo, o nível de umidade ótimo para o cultivo de *Aspergillus niger* em arroz é de 40%, entretanto, para polpa de café é de 80%. Isto ilustra a insegurança de usar a umidade como parâmetro do crescimento do microrganismo. O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água (Aa) do meio em lugar da umidade do substrato sólido (SANTOS, 2007).

Na fermentação em estado sólido, o microrganismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. A atividade de água ótima para fungos é por volta de 0,7; para leveduras 0,8 e para bactérias 0,9. Uma pequena flutuação nestes valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e metabolismo dos microrganismos (ANDRADE, 1999).

2.4.2. Microrganismo produtor de pectinase

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são produzidas somente por vegetais e microrganismos. Enzimas pectinolíticas de origem fúngica atraem mais atenção, uma vez que oferecem um enorme potencial para a indústria. Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas a partir de fungos, principalmente de *Aspergillus niger*. Na verdade pectinases microbianas são responsáveis por quase 25% do mercado global de vendas de enzimas (MOHAMED, 2009). Os fungos são os preferidos em escala industrial, já que cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio.

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptáveis ao processo de fermentação em estado sólido. São capazes de crescer em baixos valores de atividade de água e altas pressões osmóticas. O próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólicos excretados pelo microrganismo permitem a penetração das hifas

nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes (PINTO, 2003).

Na FES o crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinadas pela disponibilidade dos nutrientes, bem como pelas características do substrato. As hifas crescem ao longo da superfície da partícula sólida úmida utilizando o filme líquido como fonte de umidade e nutrientes e os poros do substrato como espaço para o crescimento em busca de novos nutrientes (SANTOS, 2007).

O *Aspergillus niger* é o mais utilizado para a produção industrial de pectinases. Este fungo sintetiza a poligalacturonase (PG) polimetilgalacturonase, (PMG), pectinliase (PL) e pectinesterase (PE) (PANDA et al, 1999).

2.4.3. Substrato

Em fermentação em estado sólido para a produção de pectinases, há a necessidade de ter-se um meio de cultivo com balanceamento adequado de nutrientes.

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos. Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos, cuja disposição no meio ambiente causam sérios problemas de poluição. Com o advento da inovação biotecnológica na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado como as enzimas (UENOJO & PASTORE, 2007).

Os componentes principais destes resíduos são a celulose, o amido, lignina, xilano e pectina. Vários são os microrganismos capazes de utilizar estas substâncias como fontes de carbono e de energia através da produção de uma vasta gama de enzimas. Substâncias pecticas são abundantes na biomassa vegetal desses resíduos, e estes constituem 4-30% nas cascas de frutas (MOHAMED, 2009).

A manga é uma das frutas tropicais mais comuns no Brasil, com produção superior a 850 mil toneladas em 2005. Após o processamento agroindustrial, 35 a 60% do peso total da

fruta são descartados na forma de resíduos, que inclui cascas e caroços. A proporção de cascas e caroços da fruta varia de 20 a 30% e de 10 a 30%, respectivamente (VIEIRA, 2008).

2.4.4. Estabilidade de enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações bioquímicas e, como tal, apresentam especialidades para os inúmeros substratos que entram nas reações do metabolismo. A desnaturação de proteínas é uma alteração sensível na estrutura original da proteína, sem que haja alteração na sequência dos aminoácidos, isto é, sem que haja rompimento ou alterações de ligações químicas primárias, que ligam aminoácidos entre si (SGARBIERI, 1996).

Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas a temperatura é que provoca mais modificações nas proteínas, dentro do contexto biológico (GOMES et al., 2007).

A maioria das proteínas são mais estáveis a temperatura de refrigeração, outras são mais estáveis a temperatura ambiente. À medida que a temperatura se eleva acima de 40 – 50°C, praticamente, todas as proteínas tornam-se instáveis, tendendo a uma alteração da conformação original. Quanto ao pH algumas proteínas mantêm suas configurações nativas a valores de pH muito baixos, se a temperatura for mantida baixa. Outras, são drasticamente desdobradas, de tal forma que apenas um pequeno decréscimo no pH é suficiente para induzir mudanças de conformação semelhantes àquelas que as proteínas mais estáveis só experimentam pela ação combinada do calor e pH baixo (SGARBIERI, 1996).

Devido às condições de processamento na indústria, como elevadas temperaturas, as enzimas podem se tornar instáveis e se tornarem totalmente inativas durante o processo, assim torna-se importante conhecer certas características das enzimas para avaliar qual melhor faixa de operação para cada uma (SOUZA, 2008).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e equipamentos

A produção de enzima foi realizada no laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Os nutrientes utilizados na formulação dos meios de cultura e seus respectivos fornecedores encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3: Listagem de reagentes.

REAGENTES	MARCAS
PDA (Potato Dextrose Agar)	Vetec
Ágar-ágar (Agarose e Agarpectina)	Vetec
3,5-dinitrossalicílico (DNS)	ALDRICH (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇)
Ácido poligalacturônico	MERCK
Ácido galacturônico	MERCK

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Listagem de equipamentos utilizados.

EQUIPAMENTOS	MARCA / MODELO
Balança analítica de precisão	MARTE AL 500C
Balança analítica eletrônica	BIOPRECISA FA-2104N
Balança centesimal	BELENG M 4102
Determinador de Umidade	Balança de umidade MARTE ID 200
Cabina de fluxo laminar vertical	AEROGLASS
Centrifuga de sorologia	CENTRIBIO 802b
Destilador kjedhal	Quimis Q328521
Determinador de atividade de água	Aqualab 4TE
Espectrofotômetro UV-VIS	BEL SP 2000 UV
Estufa para incubação	SOLAB sl 101

Incubadora SHAKER	SOLAB SL 222/CFR
Moinho de facas	Moinho de facas ACB labor SOLAB
Mufla	QUIMIS
agitador magnetico com aquecimento	SOLAB SL 91

3.2. Fluxograma de trabalho

Na Figura 5 podem ser observadas as principais etapas desenvolvidas:

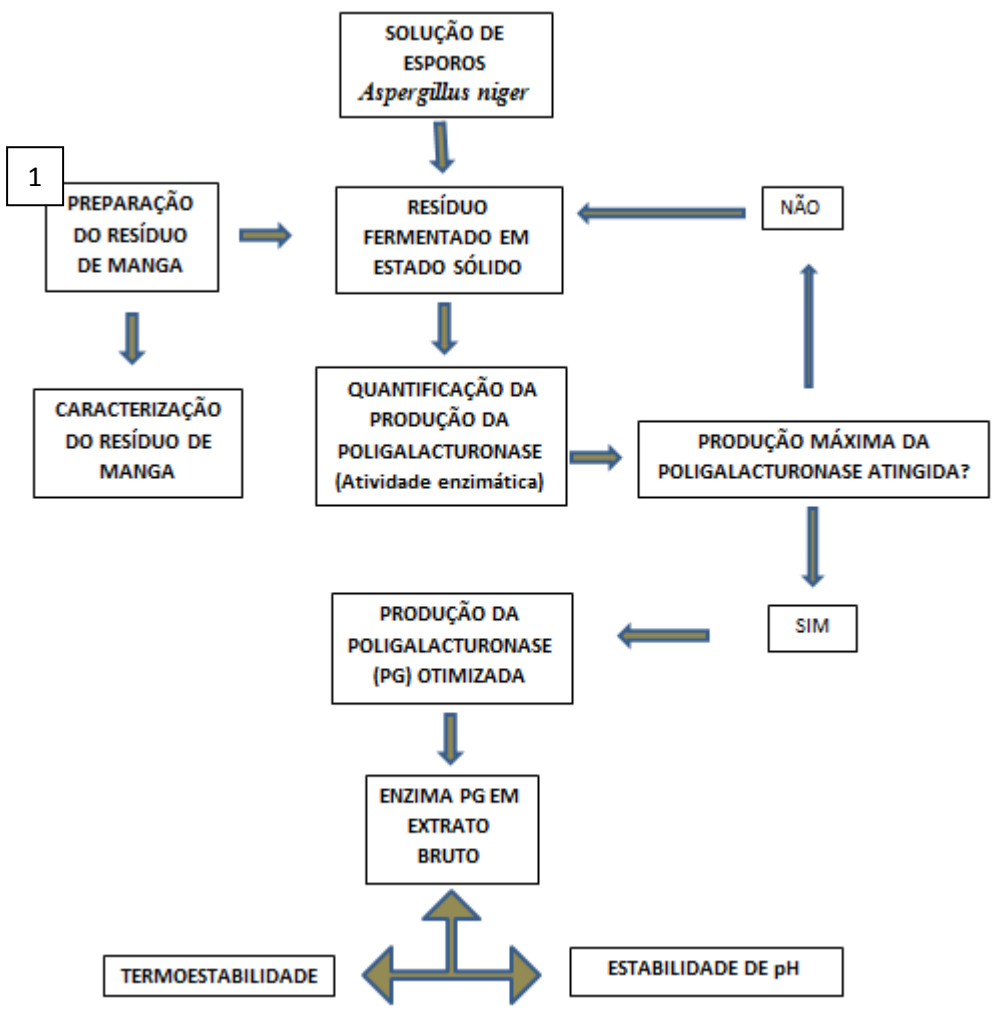


Figura 5: Fluxograma da FES.

3.3. Meio de cultivo

O resíduo de manga (Figura 6) oriundo do processamento de polpa de fruta de uma fábrica localizada na região sul da Bahia. Este rejeito foi utilizado como meio basal de cultivo para fermentação no estado sólido. O resíduo foi submetido a um processo de secagem a 70°C em estufa com circulação forçada de ar, e foi triturado em um moinho de facas tipo Willey, com peneira de diâmetro de 1,25 mm.

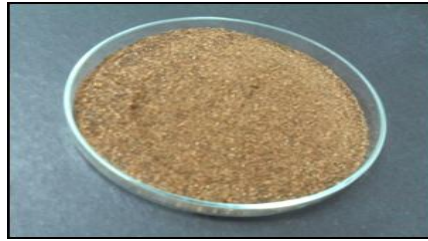


Figura 6: Resíduo de manga após secagem e moagem. Fonte: (O autor)

3.4. Caracterização do resíduo

3.4.1. Densidade aparente

Para a densidade aparente foram pesados 100 g do material e depois colocados em uma proveta, sem compactação, para determinação do volume ocupado. O valor da densidade aparente foi obtido após aplicação da Equação 2 (Souza, 2008).

$$\textit{densidade aparente} = \frac{\textit{massa,g}}{\textit{volume ocupado,cm}^3} \quad (2)$$

3.4.2. Densidade real

A densidade real do resíduo seco foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume da amostra, através do deslocamento de um líquido (óleo de cozinha) em uma proveta. Primeiramente foi colocado óleo em uma proveta e verificou-se o volume ocupado (V_1), em seguida adicionou-se uma massa conhecida do resíduo (100 g) e esperou-se que a mesma se depositasse totalmente no fundo da proveta. Por fim, fez-se a leitura do novo volume indicado pelo nível do óleo (V_2). A diferença ($V_2 - V_1$) é o volume real do pó (SOUZA, 2008).

Desta forma, a densidade real foi determinada pela Equação 3:

$$\textit{densidade real} = \frac{\textit{massa,g}}{(V_2 - V_1),\textit{cm}^3} \quad (3)$$

3.4.3. Porosidade do meio

A porosidade foi determinada conforme a Equação 4 (KEEY, 1991):

$$\text{porosidade} = 1 - \frac{\text{densidade aparente}}{\text{densidade real}} \quad (4)$$

3.4.4. pH

Foram adicionados 5 ml de água destilada a 0,5g de material fermentado, e a mistura foi vigorosamente agitada. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro (Godoy, 2009).

3.4.5. Umidade

O teor de umidade foi medido através da análise de amostras de aproximadamente 0,5 g de material fermentado diretamente em balança determinadora de umidade (Godoy, 2009).

3.4.6. Medida de atividade de água (Aa)

Amostras de aproximadamente 1,0g de material fermentado foram analisadas em um higrômetro (Aqualab), para a determinação da atividade de água nos diversos tempos de fermentação (Godoy, 2009).

3.4.7. Cinzas

As amostras foram pesadas em cadinho de porcelana e carbonizadas completamente sobre placa de aquecimento, em seguida mineralizadas em mufla (550°C) até peso constante. O teor de cinzas totais será determinado gravimetricamente (AOAC, 1984).

3.4.8. Análise de proteínas totais (proteína bruta)

O teor de proteínas totais foi determinado por meio da determinação do teor de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1984). A amostra seca (0,2g) foi digerida em bloco digestor com H₂SO₄ concentrado e na presença de mistura de catalisadores. Após diluição com água, foi adicionado NaOH em excesso para converter o N fixo em NH₄OH, destilável. O destilado foi recolhido em solução de ácido bórico e o borato de amônio e foi titulado com solução padronizada de HCl. O teor de N foi convertido para teor de proteínas pelo fator 6,25.

3.4.9. Teor de sólidos solúveis (°Brix)

A concentração de sólidos solúveis medida em °Brix é uma medida relacionada com a quantidade de açúcares presentes na amostra. Foram adicionados 9 mL de água destilada a 1g do resíduo e, após homogeneização, deixou-se a suspensão em repouso por 30 minutos, com agitação intermitente. Após este período a suspensão foi filtrada com algodão realizada a leitura em refratômetro, o resultado foi multiplicado por dez, devido à diluição, afim de determinar o teor de sólidos solúveis do resíduo (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3.4.10. Açúcares Redutores

Foi pesado 2 a 5 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transferiu para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de água. O volume foi completado, agitado e logo após filtrado em papel de filtro seco. O filtrado foi transferido para a bureta. Em um balão de 250mL, com o auxílio de pipetas de 10 mL foi colocado cada uma das soluções de Fehling A e B, adicionando 40 mL de água.

Aqueceu até ebulição. Em seguida adicionou, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passou de azul a incolor (no fundo do balão ficou um resíduo vermelho de Cu_2O) (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3.4.11. Pectinas

Os métodos de determinação de pectinas se baseiam na sua extração por água quente seguida por precipitação com álcool e, após purificação, pesagem na forma de pectato de cálcio ou ácido livre.

Pesava-se 20 g da amostra em um becker de 1000 mL, adicionando-se 400mL de solução de HCl 0,05M e leva-se para aquecimento por duas horas a 80-90°C, recolocando-se a água destilada perdida por evaporação. Após este período a suspensão era resfriada até a temperatura ambiente e então transferida para uma proveta de 500 mL completando-se o volume com água destilada. Filtrava-se com auxílio de algodão.

Do extrato filtrado media-se em proveta 200 mL e transferia-se para um becker de 1000 mL, acrescentando-se 250 mL de água destilada. A solução era então neutralizada com NaOH 1M, usando papel indicador de pH. Após neutralização, adicionava-se 10 mL de NaOH 1 M em excesso, com agitação constante. Em seguida era deixada em repouso por uma noite. No dia seguinte adicionava-se 50 mL de ácido acético 1 M e após 5 minutos

acrescentava-se 25 mL de solução de cloreto de cálcio 0,5 M sob agitação. A solução era levada à ebulição por 2 minutos e deixada em repouso por 3 horas. Após esse período era filtrada em de papel de filtro preparado antecipadamente (molhava-se o papel de filtro com água destilada, secava-se em estufa a 105°C por 2 horas, resfriava-se em dessecador e pesava-se). O precipitado era lavado com água destilada quase fervendo, até que ficasse livre de cloretos, para isto fazia-se o teste usando nitrato de prata no filtrado. O papel de filtro contendo o pectado de cálcio era seco na estufa a 105°C até peso constante Rangana (1979). A pectina foi expressa em % de pectato de cálcio através da equação (5):

$$\% \text{ Pectato de cálcio} = \frac{\text{peso do pectato de cálcio} \times 500 \times 100}{\text{mL do filtrado} \times \text{peso da amostra}} \quad (5)$$

3.4.12. Determinação dos compostos fibrosos (Celulose, Hemecelulose e Lignina)

Primeiramente a amostra sofreu um pré-tratamento com uréia a 8 M e α -amilase (15 μ L) para realizar a hidrólise do amido e impedir a sua gelatinização. Logo após a amostra foi tratada com detergente neutro (FDN) para a separação das fibras insolúveis do meio. Essas fibras constituem basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada.

Em seguida, o precipitado foi seco em estufa a 105°C e pesado. Na determinação de fibra detergente ácido (FDA), utilizou-se um detergente ácido específico, para solubilizar o conteúdo celular, e a hemicelulose, além da maior parte da proteína insolúvel. Obteve-se um resíduo insolúvel no detergente ácido, constituído, em sua quase totalidade de lignina e celulose (lignocelulose).

A lignina foi hidrolisada com ácido sulfúrico (72%), deixando no cadinho apenas celulose e minerais insolúveis. Todas as análises de fibras foram realizadas como descrito por Silva e Queiroz (2002).

3.5. Microrganismo

Foi utilizada uma cepa do fungo filamentoso (*Aspergillus niger*) pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA da UESB campus de Itapetinga.

3.6. Preparo do inóculo (solução de esporos)

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação dos esporos da cepa de *Aspergillus niger* (Figura 7) a 35°C por 7 dias em meio com a seguinte composição: Agar-ágar e PDA.

Os esporos foram então raspados, suspensos em tampão acetato de sódio (200 mM, pH 4,5) e contados em câmara de Neubauer conforme o método de Freire (1996) descrito por Godoy (2009). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/g de resíduo sólido.



Figura 7: *Aspergillus niger* a 35°C. Fonte: (O autor).

3.7. Fermentação em estado sólido para otimização da produção da poligalacturonase

Foram empregados erlenmeyers de 250 ml, como biorreatores, com 15 g de rejeito. Como meio de cultivo foi empregado o resíduo de manga. Os erlenmeyers foram autoclavados a 1,0 atm por 15 minutos e após o resfriamento, inoculava-se sobre o substrato a suspensão esporos na concentração de 10^7 esporos/grama de substrato. As fermentações foram conduzidas em estufa nas temperaturas de 25, 30 e 35°C e umidades 30, 40 e 50% correspondendo a atividades de água (0,883, 0,931, 0,958). Além dos pontos do planejamento experimental. A amostragem foi realizada conforme planejamento experimental para determinação da atividade enzimática.

O cálculo do volume de água adicionado para se chegar as umidades desejadas foi realizado mediante o conteúdo de matéria seca do resíduo.

3.8. Extração da Enzima

Ao final da fermentação, foi adicionado 2,5 de tampão acetato de sódio (200 mM, pH 4,5) por grama de rejeito fermentado. A extração enzimática foi realizada em um agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 60 minutos. Posteriormente, o rejeito fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato bruto enzimático, o qual foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da atividade enzimática.

3.9. Quantificação da atividade de Poligalacturonase

A atividade da poligalacturonase do extrato enzimático foi baseada no aumento dos grupos redutores formados por ação da enzima. Em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25% (p/v) preparada em tampão acetato 200mM (pH 4,5), previamente aclimatado a 35°C, adicionou-se 0,25mL de extrato enzimático, prosseguindo a reação enzimática por 30 minutos a 35°C. Terminada a reação, transferiu-se 0,25mL da mistura reacional para tubos de ensaio contendo 1 mL do reagente 3,5 – dinitrossalicílico (DNS), após homogeneização adicionava-se 0,75mL de água destilada e seguia-se o procedimento para análise dos grupos redutores.

Os ensaios foram feitos em duplicatas, nos ensaios em branco (também em duplicata), a enzima foi adicionada ao ácido poligalacturônico e imediatamente transferida para os tubos contendo o DNS. A curva padrão foi feita com solução de ácido galacturônico na faixa de 0 a 1 mg/mL. Uma unidade de atividade corresponde à quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido galacturônico por minuto de reação, nas condições de reação. Assim, o cálculo da atividade é feito de acordo com a Equação 6. Os resultados foram expressos em unidades de atividade por grama de meio fermentado (U/g).

$$ATIV = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times f \times 17 \times 4 \times 2,5}{212,16 \times 30} \quad (6)$$

Em que,

ATIV - Atividade da poligalacturonase (U/g)

Abs_{amostra} - Absorbância da amostra

$Ab_{S_{branco}}$ - Absorbância do branco

f - Fator de conversão da curva padrão de ácido galacturônico (mg/L)

17 - Diluição da enzima no meio reacional

4 - Diluição dos grupos redutores no reagente DNS

212,16 - Peso molecular do ácido galacturônico (g/mol)

30 - Tempo de reação (min.)

2,5 - Razão solvente/meio usado na extração (mL/g)

3.10. Determinação da termoestabilidade

A estabilidade térmica da poligalacturonase foi determinada incubando-se a enzima (extrato bruto obtido nas condições otimizadas) em banho-maria cuja temperatura foi ajustada em 20, 40, 60, 80 e 100°C. As alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 20, 50, 90, 130, 170, 210 e 250 minutos e imediatamente acondicionadas em banho de gelo para posterior ensaio de atividade, como descrito no item 3.9. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%) em função da atividade máxima encontrada após a otimização da enzima, que demonstra a porcentagem que enzima permanece ativa.

3.11. Determinação da estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação das alíquotas da enzima (extrato bruto) nos tempos 20, 50, 90, 130, 170, 210 e 250 minutos incubação nos pH: 3, 4, 5, 6, 7 e 8 em tampão acetato de sódio (200 mM). Os resultados foram expressos como atividade relativa (%) em função da atividade máxima encontrada após a otimização da enzima, que demonstra a porcentagem que a enzima permanece ativa.

3.12. Planejamento experimental para otimização da produção da poligalacturonase

Com o objetivo de verificar a influência das variáveis: valor inicial de umidade, tempo, temperatura de fermentação na otimização da produção da poligalacturonase, foi elaborado um planejamento experimental fatorial fracionado 2^3 , utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 8 pontos fatoriais, 6 pontos

axiais ($\pm \alpha = 1,6818$) e 3 repetições no ponto central, para o cálculo de resíduos e erro padrão. A partir da verificação dos resultados foram aplicados na metodologia de Superfície de Resposta (SR), a fim de obter o ponto máximo de produção da enzima. Assim, o planejamento fatorial consistiu em 17 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo*.

Ensaio	Fatorial em valores codificados			Fatorial em valores reais		
	(X ₁ , %)	(X ₂ , h)	(X ₃ , °C)	(X ₁ , %)	(X ₂ , h)	(X ₃ , °C)
1	-1	-1	-1	30	24	25
2	-1	-1	+1	30	24	35
3	-1	+1	-1	30	72	25
4	-1	+1	+1	30	72	35
5	+1	-1	-1	50	24	25
6	+1	-1	+1	50	24	35
7	+1	+1	-1	50	72	25
8	+1	+1	+1	50	72	35
9	- α	0	0	23,18	48	30
10	+ α	0	0	56,81	48	30
11	0	- α	0	40	7,63	30
12	0	+ α	0	40	88,36	30
13	0	0	- α	40	48	21,59
14	0	0	+ α	40	48	38,41
15	0	0	0	40	48	30
16	0	0	0	40	48	30
17	0	0	0	40	48	30

*Matriz do planejamento experimental.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R^2). Em primeiro

lugar, os resultados obtidos a partir de experiências e foram submetidos a análise de variância ANOVA, e os efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,1$. Com um modelo polinomial de segunda ordem (Eq. (7)), dados experimentais e de regressão de coeficiente foram determinados e coeficientes de regressão foram obtido por regressão linear múltipla, onde b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} , e b_{ijk} representa todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de X_i , e o efeito de interação entre X_i e X_j , X_i , X_j e X_k sobre a atividade enzimática, respectivamente.

$$EA = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad (7)$$

O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*[®] (SAS) versão 9.3, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software *Sigma Plot*[®] versão 11.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do substrato

Os resultados da caracterização do resíduo agroindustrial de manga encontram-se na Tabela 6. As análises foram realizadas em duplicata.

Tabela 6: Caracterização do resíduo de manga.

Parâmetros Analisados	Valor
Densidade Aparente (g/cm ³)	0,58 ± 0,009
Densidade Real (g/cm ³)	0,79 ± 0,01
Porosidade	0,27 ± 0,002
pH	3,90 ± 0,0
Umidade (%)	4,65 ± 0,25
Atividade de água	0,38 ± 0,0
Cinzas (%)	0,03 ± 0,0005
Sólidos solúveis (°Brix)	32,70 ± 0,0
Açúcares Redutores (%)	24,60 ± 0,63
Pectina (%)	9,62 ± 0,115
Proteína (%)	6,73 ± 0,04
FDN (%)	17,72 ± 1,175
FDA (%)	13,95 ± 0,66
Lignina (%)	3,79 ± 0,41
Celulose (%)	10,16 ± 0,25
Hemicelulose (%)	3,77 ± 0,515

É importante lembrar que, de forma geral, a caracterização deve ser feita para cada substrato e pode variar drasticamente dependendo da época de colheita, e práticas agrícolas relacionados com o plantio. Sendo então de extrema importância a caracterização do substrato para o processo de fermentação em estado sólido e, conseqüentemente, o ajuste de determinados parâmetros (ALCÂNTARA et al., 2007).

Como a maioria dos resíduos agroindustriais, o resíduo de manga contém grande quantidade de compostos como celulose, hemicelulose, pectina e outros, não havendo necessidade de grandes complementações nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano (COELHO et al, 2001). Estes compostos funcionam como indutores para a produção de enzimas extracelulares, tal como a pectina na produção da poligalacturonase.

A caracterização física com relação à morfologia do substrato é essencial, sobretudo, quanto ao tamanho e a porosidade, porque estas propriedades governam a área superficial acessível ao microrganismo. O tamanho médio das partículas de resíduo do meio fermentativo deve ser obtido de forma que não se tenha nem partículas grandes, nem pequenas. (ALCÂNTARA et al, 2007).

O resíduo que foi seco e triturado em peneira mesh 20, correspondendo a 1,25mm, apresentou densidade aparente de $0,58 \text{ g/cm}^3$, revelando que o resíduo tende a não se compactar completamente, fator propício ao desenvolvimento de microrganismo, permitindo a circulação de ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo (DEL BIANCHI et al., 2001). Mas apresentou porosidade baixa, de 0,27, já que a porosidade está relacionada com a densidade real do resíduo que foi de $0,79 \text{ g/cm}^3$.

O valor de pH do resíduo foi de 3,9. O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos tem como condição favorável de desenvolvimento pH baixo (4,5 – 5,0) (SANTOS, 2007). Para o processo de fermentação em estado sólido o pH do meio é um parâmetro de difícil controle. A padronização do pH do substrato pode se dar durante a sua preparação. Há componentes com capacidade tamponante, os quais podem ser adicionados ao meio de modo a evitar flutuações drásticas de pH. A adição pode ser efetuada desde que a substância não exerça nenhum papel deletério sobre a atividade biológica (Pandey et al., 2001). Na faixa de pH encontrada, 3,9, o resíduo foi armazenado em temperatura ambiente sem problemas de contaminação ao longo do todo o desenvolvimento do trabalho. Para o processo de fermentação foi utilizado solução tampão, pH 4,5, afim de corrigir o pH para que não houvesse inibição do crescimento do fungo.

Souza et al. (2010) sugerem que o pH do resíduo em torno de 3,5, possui as condições adequadas para a adaptação do microrganismo ao meio. Zheng & Shetty (2000),

determinaram que o pH igual a 5,0 foi considerado ótimo para a produção de PG, por *Lentinus edodes*. Bueno et al. (2005) sugerem a condição de pH 4,5 para a produção de poligalacturonase pelas linhagens de *Aspergillus* sp CFCF-0492, *Aspergillus* sp CFCF-HC1 e *Aspergillus* sp CFCF-CC1, isoladas do solo. Malvessi & Silveira (2004) estudaram meios com pH inicial variando 2 a 7 e observaram máxima atividade da enzima com pH inicial do meio de 4, usando o *Aspergillus oryzae*.

A umidade obtida, após a secagem e moagem do resíduo *in natura*, foi de 4,65 %, que corresponde, para o resíduo de manga, em uma atividade de água (Aa) de 0,38. Alguns autores (ANTIER et al., 1993; CASTILHO, 1997; TARAGANO & PILOSOFF, 1999) citam a utilização de diversos substratos para produção de pectinases pelo *Aspergillus niger* com atividade de água acima de 0,93. É importante salientar que baixos níveis de atividade de água significam baixa disponibilidade de moléculas de água nas proximidades das células, dificultando a troca de solutos na fase sólida, diminuindo o metabolismo e gerando menores velocidades de crescimento ou de síntese de metabólitos. Em contrapartida, elevados índices de atividade de água dificultam a difusão de ar pelas partículas sólidas, levando à redução no crescimento microbiano (ABUD et al., 2007).

A literatura cita diversos teores iniciais de umidade para a produção de pectinases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Couri & Farias (1995) empregaram um meio a base de farelo de milho e soja, contendo 37,5% de umidade. Castilho (1997) usando farelo de trigo e soja realizou testes para teores iniciais de umidade de 25%, 40%, 55% e 70%; com atividade de água correspondente a 0,90; 0,95; 0,98 e 0,99; respectivamente, verificou que teores entre 40 e 55% são os mais propícios à síntese de pectinases pelo fungo. Antier et al (1993), para selecionar linhagens mutantes de *A. niger* para produção de pectinases por fermentação em estado sólido, utilizaram meios com atividade de água de 0,96.

Assim, no presente trabalho para que o resíduo fosse utilizado na fermentação em estado sólido foi preciso elevar o teor de umidade inicial do meio para 30%, 40% e 50% o que representa valores de atividade de água no resíduo de 0,883, 0,931, 0,958 respectivamente.

O teor de sólidos solúveis obtido para o resíduo de manga foi de 32,7 °Brix e condiz com o teor de açúcares redutores, que foi de 24,6%. A literatura mostra que altas concentrações de açúcares no meio suprem a necessidade dos microrganismos para seu crescimento e a pectina no meio é pouco utilizada. Em condições restritivas de concentração

de açúcares o metabolismo é direcionado para a quebra da molécula de pectina, de modo que possa ser consumida, levando a altas atividades pectinolíticas (Fawole & Odunfa, 2003). FONTANA et al. (2005) produzindo PG por *Aspergillus niger*, em um meio a base de farelo de trigo, afirmaram que altas concentrações de açúcares (glicose), acima de 10%, exercem efeito inibitório sobre a atividade enzimática, mas que, altos rendimentos em enzimas são obtidos em meios que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina.

A produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* é induzida pela presença de pectina no meio de cultura. A maior parte das pectinases comerciais são enzimas indutíveis, e substratos com alto teor de pectina estimulam a produção da enzima. Dartora et al. (1999), estudando diversos fungos filamentosos, inclusive *Aspergillus niger* na produção de pectinases e utilizando farelo de trigo como principal fonte de carbono, observaram que, adicionando-se pectina na concentração de 10%, tem-se o valor ótimo para que se perceba um efeito de indução sobre a produção da enzima. O resíduo aqui estudado apresentou um teor de pectina de 9,62%, sendo muito próximo do considerado ideal, indicando seu potencial para a fermentação em estado sólido para a produção de poligalacturonase.

O teor de proteínas de 6,73%, no resíduo de manga viabiliza a sua utilização como meio fermentativo por ser uma ótima fonte de nitrogênio, nutriente este, imprescindível ao metabolismo microbiano. O resíduo apresentou um teor de proteína superior, ou muito superior, ao dos resíduos de algumas frutas que estão sendo estudados recentemente para produção da poligalacturonase, como mangaba, goiaba, acerola, umbu e maracujá, de acordo com os dados de Abud et al. (2007) e Souza et al. (2010), que apresentaram teores de 0,64%; 0,58%; 0,52%, 0,43% e 5,72% respectivamente. MENEZES ET AL., 2006 estudaram a influência da concentração de nitrogênio na eficiência do processo de produção da poligalacturonase e verificaram que houve um aumento de 72,6% da atividade poligalacturonase quando suplementados com 0,9% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio).

As fibras são os componentes mais abundantes do resíduo, pois cascas e envoltórios da semente e sementes são tecidos de revestimento e contêm elevados teores de celulose, hemicelulose e lignina. O resíduo apresentou os seguintes teores: 17,72% para Fibra em detergente neutro (FDN); 13,95% para fibra em detergente ácido (FDA); 3,79% para lignina; 10,16% para celulose; e 3,77% para hemicelulose. O conteúdo de fibra em detergente neutro é o maior, e expressa melhor o conteúdo de fibras do resíduo. O farelo contém baixos teores

minerais, apresentando 0,03% de cinzas. As espécies fúngicas filamentosas possuem a capacidade de decomposição dos polímeros orgânicos de celulose, hemicelulose e lignina, e são grandes responsáveis na produção de proteínas solúveis e enzimas extra celulares, como afirma Santos et al. (2012). Diversos meios de suplementação são usados para suprir os requerimentos nutricionais dos microrganismos, em termos de carbono e minerais. A resposta das células fúngicas aos diferentes meios varia com a concentração, o que requer o estudo das exigências nutricionais do microrganismo para estimular uma efetiva biossíntese enzimática e atingir expressivas produtividades (RODRIGUES-ZÚÑIGA et al, 2011).

4.2. Otimização da produção da poligalacturonase

A fim de avaliar quais os fatores (umidade, tempo e temperatura) que tiveram um efeito significativo sobre atividade enzimática da poligalacturonase, foi conduzida a análise de variância (ANOVA) (Tabela 7) e os parâmetros de estimativa foram conduzidos com em fatorial fracionado 2³. A análise de variância para o modelo foi realizada e a significância do modelo foi examinada utilizando o teste estatístico de Fisher (teste F), aplicando a diferenças significativas entre as fontes de variação dos resultados experimentais, por exemplo, o significado de regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R²). Uma vez que a totalidade dos modelos de segunda ordem (modelos que contêm todas as interações de parâmetros) não foram aceitos pelos ensaios mencionados, foram melhorados com a eliminação de coeficientes até que as condições determinadas foram atendidas. Todos os fatores que não foram significativas a 10% foram então agrupadas no termo de erro, e um novo modelo reduzido foi obtido para a variável resposta pela análise de regressão utilizando apenas o fator de significativa indicados anteriormente.

Tabela 7: Análise de Variância.

FV	GL	SQ	QM	F	Prob
Modelo	7	97,94033	13,99148	6,82	0,0052
Erro	9	18,46185	2,05132		
Total	16	116,40219			
R ²	0,8414				

O resultado da análise de variância pode ser visualizado num diagrama de Pareto (Figura 8), em que o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado estimada (o efeito de estimativa dividida pelo desvio padrão) de cada elemento é traçado em ordem decrescente e

comparados a magnitude mínima de um fator estatisticamente significativa, com 90% de confiança ($p = 0,10$), representada pela linha vertical tracejada. A partir desta figura 8 pode-se observar que as duas variáveis mais significativas para a produção da enzima poligalacturonase foram a temperatura e tempo de fermentação. As interações entre as variáveis tempo, temperatura e umidade não foram significativas para a atividade enzimática.

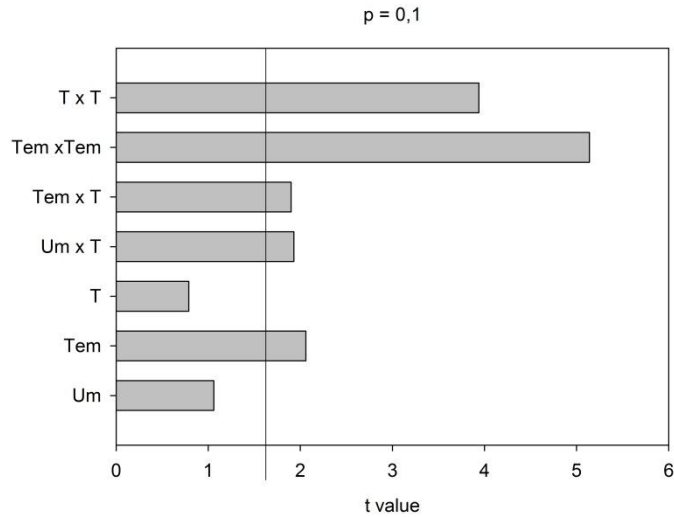


Figura 8: Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis tempo, temperatura e umidade de fermentação sobre a atividade da poligalacturonase.

O modelo reduzido pode ser descritos por equações (8), em termos de valores não codificados.

$$AT_{(PG)} = -65,99467 + 0,54536Um + 0,07471Tem + 4,19346T - 0,01955UmT + 0,00802TemT - 0,00363Tem^2 - 0,06430T^2 \quad (8)$$

Onde:

Um = Umidade (%)

Tem = Tempo (h)

T = Temperatura (°C)

A Figura 9 ilustra o efeito das combinações de variáveis independentes tempo (Tem) e temperatura (T) sobre a atividade da enzima poligalacturonase, a partir do modelo ajustado (Equação 8). As condições ótimas para a produção da poligalacturonase são no tempo de 43 horas e na temperatura de 28,78°C, que passaram a ser utilizadas em experimentos posteriores. É necessário considerar que o *Aspergillus niger* produz a enzima utilizando

resíduo de manga em toda faixa umidade estudada de 30, 40 e 50 %, que correspondem a Aa de 0,883, 0,931, 0,958 respectivamente. Nestas condições, a atividade máxima da poligalacturonase prevista pelo modelo é de 7,17 U/g, muito próximo ao valor real obtido de 7,66U/g. No tempo e temperatura reais de 48h e 30°C, respectivamente.

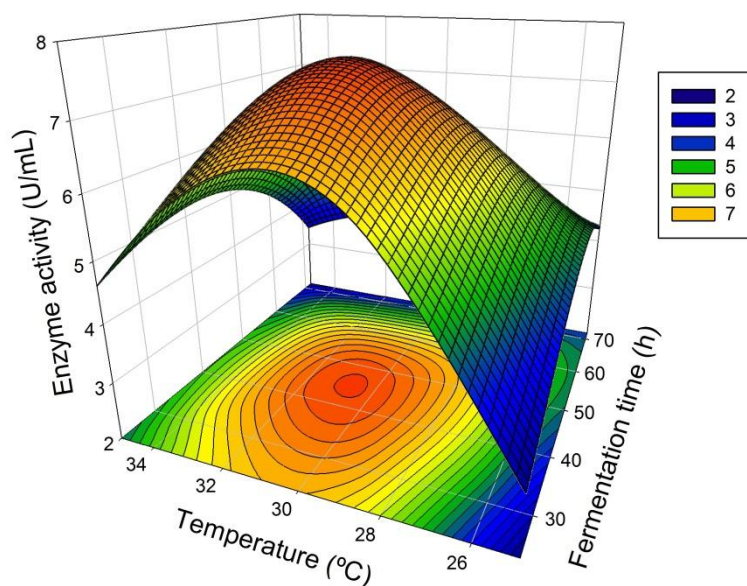


Figura 9: Superfície de Resposta do modelo ajustado.

Este valor de atividade, 7,17 U/g, é inferior aos citados na literatura para poligalacturonase obtida a partir de resíduos de frutas, sendo 12 U/g para bagaço de laranja, possivelmente com um elevado teor de pectina o que pode ter induzido a produção da enzima, e 7,5 U/g para casca de banana, e foi superior a 5 U/g para casca de manga, utilizando *Penicillium viridicatum* RFC3, atividades estas atingidas com mais do dobro do tempo de fermentação, 96 horas (SILVA ET AL., 2002). Santos, (2008) encontrou atividade de 16 U/g utilizando pedúnculo de caju em 30 horas de fermentação, e Alcântara, (2008) em encontrou atividade de 8,5U/g em 23 horas de fermentação, mas ambos usaram suplementação de nitrogênio.

Zheng & Shetty (2000) encontraram atividade de 29,4 U/g e 20,1 U/g para bagaço de morango e maçã, mas usando suplementação com ácido poligalacturônico, o que aumenta o custo do processo, e estes valores foram obtidos após 40 dias de fermentação usando *Lentinus edodes*. Menezes et al., (2006) utilizando resíduo de maracujá suplementado na fermentação

em estado sólido em colunas aeradas encontraram o valor máximo de 12,01 U/g da atividade poligalacturonase, mas após 64h de fermentação. Então, em termos de produtividade dentre estes resíduos o resíduo de manga apresenta-se como um bom substrato para a produção de poligalacturonase.

4.3. Estabilidade

A caracterização enzimática é importante para conhecer particularidades como termoestabilidade e estabilidade ao pH, informações relevantes para a aplicação industrial e que serão necessárias para manter o nível desejado de atividade da enzima por um período de tempo.

Em relação à estabilidade térmica da enzima poligalacturonase (Figura 10), em todas as faixas de temperatura estudada a enzima se manteve ativa, e após 150 minutos de incubação houve um decréscimo da atividade para todas as temperaturas. A enzima foi totalmente inativada em 250 minutos para todas as temperaturas estudadas, com exceção da incubação da enzima a temperatura de 60°C, que ainda apresentou cerca de 6% de sua atividade máxima.

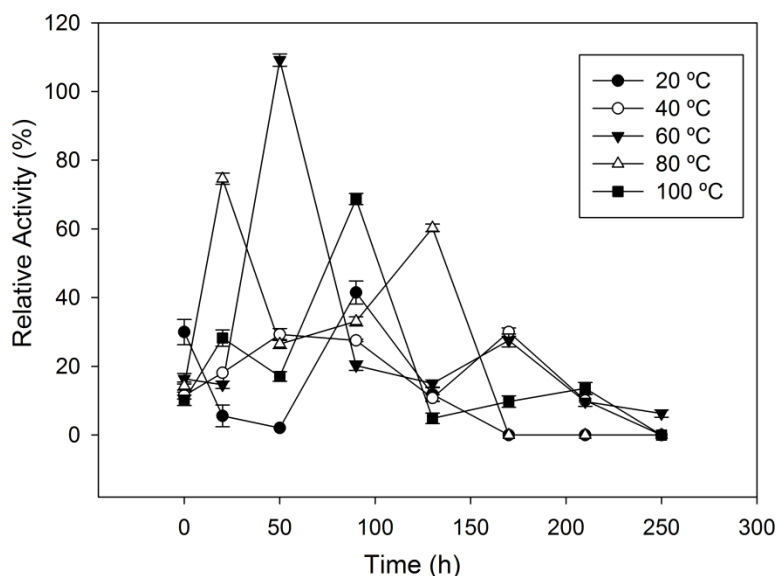


Figura 10: Estabilidade térmica da enzima poligalacturonase.

Na temperatura de incubação em 20°C a enzima atingiu 41% da atividade máxima em 90 minutos, se mantendo ativa até 130 minutos. Após esse tempo houve a sua inativação. A 40°C a enzima atingindo 29% da atividade máxima no tempo de 170 minutos, e se manteve ativa até 210 minutos, sendo inativada após esse tempo. A 60°C a enzima atingiu 109% da atividade enzimática máxima no tempo de 50 minutos, se mantendo ativa até 250 minutos. A 80°C a enzima se manteve ativa até 130 minutos, após esse tempo foi inativada, atingindo 74% da máxima de atividade, em 20 minutos. A 100°C a enzima se manteve ativa até 210 minutos, atingindo 68% da atividade máxima em 90 minutos.

A atividade enzimática não foi constante nas temperaturas estudadas durante o período de incubação, apresentando picos de atividades relativas específicas para cada temperatura estudada, e perdas da atividade relativa e inativação da enzima em diferentes tempos para cada temperatura. Porém pode-se constatar que mesmo em temperaturas elevadas e em período relativamente longo, 90 minutos, foi possível observar uma atividade relativa superior a 20%. Em 60°C no tempo de 50 minutos o resultado encontrado (109% da atividade máxima) é de grande importância, pois a maioria dos processos industriais utilizam temperaturas em torno de 50°C, para tratamento com pectinases comerciais, as quais são termolábeis, o que denota uma aplicação favorável no meio industrial.

O resultado 74% da atividade relativa na temperatura de 80°C no tempo de 130 minutos demonstra ainda mais a aplicabilidade do resíduo de manga para a produção da poligalacturonase. Na maceração da uva para extração de suco, a incubação a 60–65 °C promove a plasmólise da membrana e rupturas na parede celular do fruto, facilitando a liberação do líquido e de antocianinas responsáveis pela cor do suco.

Na extração de sucos de uva para produção de vinhos, a fruta macerada é tratada a 80 °C para, além de facilitar a maceração, desnaturar oxidases que causam perda da cor do vinho durante a estocagem. Na extração do “pulp wash”, a polpa da laranja (mistura de polpa e semente), resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90 °C para desnaturar a pectina esterase da fruta, que causa problemas de coagulação da pectina. Além das funções citadas, o tratamento térmico ainda tem por finalidade a pasteurização dos sucos e mostos, visando à redução da microbiota contaminante, principalmente de leveduras. Em todos esses processos citados, o material submetido ao aquecimento precisa ser posteriormente resfriado a 50 °C para tratamento com pectinases comerciais, as quais são termolábeis. O uso de

pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo tempo e custo dos processos (GOMES et al, 2007).

A extração de açúcar de beterraba, responsável por 29% da produção mundial de açúcar, requer a despectinização para aumento do rendimento, visto que mais de 30% do peso seco da beterraba corresponde à pectina. Industrialmente, essa extração é feita em temperaturas de aproximadamente 70°C e, dessa forma, uma despectinização simultânea à extração, usando pectinase termoestável, seria economicamente interessante (Gomes, 2007). A produção de poligalacturonase termoestável pelo fungo termófilo *Sporotrichum thermophile Apinis*, foi relatada por Kaur et al.(2004), a qual, aplicada na extração de sucos de banana, uva e maçã, a 55 °C, proporcionou considerável aumento no rendimento.

As enzimas como todas as proteínas são formadas por uma sequência de aminoácidos que caracterizam a estrutura primária. Tais aminoácidos podem apresentar grupos iônicos que podem estar carregados positivamente ou negativamente dependendo do pH em que a molécula da enzima encontra-se dissolvida. Assim, o pH afeta os grupos presentes no sítio ativo e alteram a atividade enzimática pois haverá uma alteração na configuração tridimensional do sítio ativo, o que irá interferir na atividade enzimática. Logo, as enzimas são ativas apenas em faixas estreitas de pH e haverá um pH ótimo no qual a atividade é máxima nas condições determinadas (SHULER et al. 2001).

A enzima poligalacturonase produzida pelo *A. niger* não apresentou boa estabilidade na faixa de pH de incubação estudada (Figura 11), apresentando grandes variações em relação ao tempo em cada pH. No pH 3 a enzima atingiu 157% da atividade relativa máxima no tempo de 20 minutos, se mantendo ativa durante todo o período de incubação, a melhor atividade máxima encontrada na faixa de pH. Mas a enzima apresentou as maiores variações de atividade relativa durante o longo do tempo. Em pH 4, pH 5, pH 6 de incubação a enzima atingiu respectivamente 77%, 48% e 37% da atividade máxima nos tempos de 250 minutos para pH 4 e 5, e no tempo de 20 minutos para pH 6. Em pH 7 e 8 de incubação a enzima atingiu respectivamente 51% e 25% da atividade máxima no tempo de 90 minutos. Sendo a estabilidade em pH 8 a que menos variou durante o tempo.

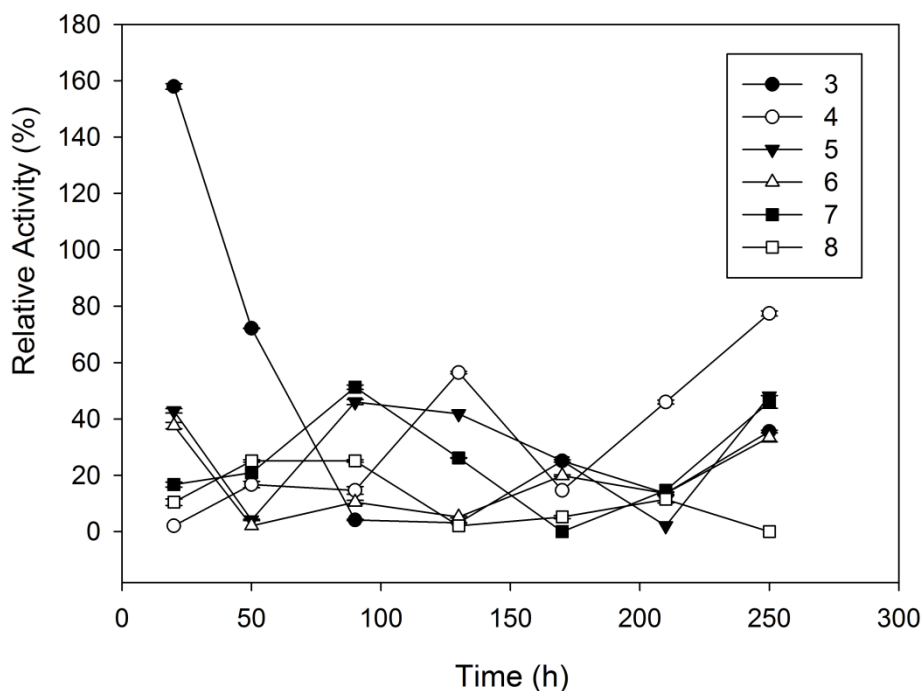


Figura 11: Estabilidade ao pH da enzima poligalacturonase.

No entanto, esses resultados mostram boa tolerância a valores de pH entre 3,0 e 4,0. Considerando que o pH natural de sucos é ácido, esta enzima poderia ser utilizada nos processos industriais de extração e clarificação destes sem perda considerável de sua estabilidade, dentro dos espaços de tempo determinados para cada pH. E em pH 6,0 e 8,0 observou-se uma diminuição da atividade da poligalacturonase. Estes resultados se aproximam dos encontrados por ZHENG & SHETTY (2000), na qual a PG produzida apresentou boa termoestabilidade em temperaturas até 50°C, porém estes autores conseguiram uma enzima estável apenas ao pH 6,5 e para valores de pH elevados (acima de 9,0) por esta ser muito instável.

O que se pode notar é que os sítios ativos da enzima permaneceram representativos a uma longa faixa de pH, mesmo não permanecendo estáveis durante os tempo de incubação, o que pode está relacionado com o estado bruto do extrato enzimático aqui testado, ou com a propriedade da fermentação em estado sólido utilizando fungos filamentosos que é tida como mais eficiente na produção de enzimas estáveis a temperatura e pH.(SANTOS et al. 2012). Para maioria dos usos industrial, as poligalacturonases produzidas por fungos, como *Aspergillus niger*, provam ser útil pela alta atividade e atividade ótima em faixa de pH baixa

servindo para grande parte das aplicações em processos com frutas e vegetais (SANTOS, 2007).

5. CONCLUSÃO

- O substrato de resíduo agroindustrial de manga pode ser considerado viável para produção de poligalacturonase, conforme ficou demonstrado pelos valores de atividade enzimática encontrados, mesmo com a baixa porosidade o que poderia comprometer o processo fermentativo. Apresentou condições favoráveis a adaptação do fungo *Aspergillus niger* a níveis de pectina e proteína, com teores respectivamente de 9,62% e 6,73%, propícios para produção desta enzima.
- A utilização da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta permitiram observar que os conteúdos de umidade estudados não tiveram influência na produção enzimática. A máxima produção (processo otimizado) de poligalacturonase, com atividade de 7,66 U/g, foi obtida em 43 horas de fermentação na temperatura de 28,78°C.
- Quanto ao estudo de estabilidade da poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto, esta mostrou boa estabilidade até em temperaturas altas. Com de resultado 74% da atividade relativa na temperatura de 80°C no tempo de 130 minutos. Em temperaturas acima de 100°C ainda pode ser detectada.
- Quanto ao estudo de estabilidade em relação às variações de pH, a enzima não apresentou boa estabilidade em relação aos tempos nos valores de pH entre 3,0 e 8,5. Mas apresentou 157% de atividade relativa em pH 3. Apresentando atividade em todas as faixas estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A. K. S.; SILVA, G. F.; NARAIN, N. Caracterização de resíduos de indústria de processamento de frutas visando a produção de pectinases por fermentação semi-sólida. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 16, 2007, Curitiba. Anais... Curitiba: UFPR, 2007. CD-Rom

ALCÂNTARA, S. R. Produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço do pedúnculo do caju: influência da atividade de água e fonte de nitrogênio. Dissertação de mestrado em Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande, 2008.

ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F.L. H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.9, n.2, p.137-142, 2007.

ANDRADE, A.T. Estudo da atividade de água na produção de amiloglicosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento de arroz. Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Ambientais, Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1999.

ANTIER, P. H., MINJARES, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., VINIEGRAGONZÁLEZ, G. Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. Enzyme and Microbial Technology, v.15, n.3, p.254-260, 1993.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC, 14th ed. Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1984.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, v.18, n. 5, p. 355–383, 2000.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. Polímeros: Ciência e Tecnologia – p. 38-44, Jul/Set -1999.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GOMEZ, R. J. H. C., PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. Ciências Agrotécnicas, v.24 (Edição Especial), p.137-152, 2000.

BUENO, M. C.; PERES, M. F. S.; GATTÁS, E. A. L. Produção de poligalacturonase por três linhagens de *Aspergillus* isolados do solo. Alimentos e Nutrição, v.16, n.3, p.253-257, 2005.

CASTILHO, L. R. Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.. Tese (Mestrado) – Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 1997.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B. ceppa, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 3342, jan./jun. 2001.

CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. 1993. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. Revista de Microbiologia, v.26, n.4, p. 314-317, 1995.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8, Process Biochemistry, v.35, n.3, p. 255 – 261, 2000.

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

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; SCANDOLARA C.; COSTA, J. A. V.; SILVEIRA, M. M. Estudo comparativo da produção de pectinases por fermentação semi-sólida com

diferentes fungos filamentosos. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 6, CD-Rom, Maringá, 1999.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. vol.2.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, cap. 13, p. 250-254, 2001.

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

FONTANA, R. C; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.32, p.371-7, 2005.

GODOY, M. G. Produção de lipase microbiana e dextoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, RJ. 2009.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, v. 30, n.1, p. 136 – 145, 2007.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. Process Biochemistry 38 (2003) 987/996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 14-15.

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

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

KAUR, G, SATYNARAYANA, T (2004) Production of extracellular pectinolytic, cellulolytic and xylanolytic enzymes by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis in solid state fermentation. Indian J Biotechnol 3:552–557.

KEEY, R.B. Drying of loose and particulate materials. New York: Hemisphere, 57 p. 1991.

KOBLITZ, M.,G.,B. Bioquímica de Alimento : Teoria e Aplicações Práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

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

MARTIN, N.; GUEZ, M. A. U.; SILVA, R.; GOMES, E. Utilização de resíduos agroindustriais em Fermentação em Estado Sólido (FES) para avaliar a produção de Poligalacturonase (PG) pelo fungo termofílico *Rhizomucor* sp N31. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Anais. Curitiba, 2007. CD.

MARTINS, E. Purificação e caracterização bioquímica de poligalcturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 108f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2006.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO M. C. T.; OLIVEIRA M. A. C. L.; COURI S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *aspergillus niger* mutante 3t5b8 em fermentação semisólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Exatas e da Terra. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1., p. 15-27, 2006.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, v. 68, p. 61 – 138, 2000.

MOHAMED, S. A.; AL-MALKI, A. L.; KUMOSANI T. A. Characterization of a Polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* Grown on Citrus Peel with Application for Apple Juice. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(3): 2770-2777, 2009.

MOHAMED, S. A.; FARID, N. M.; HOSSINY, E. N; BASSUINY, R. I, Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. Journal of Biotechnology 127, 54–64, 2006.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDA T.; NAIDU, G.S.N., SINHA J. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. Process Biochemistry 35, 187–195, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. v.13, n.2, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v. 77, p. 149 162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid–state fermentation in biotechnonogy: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech, 2001.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. Rev. Quím. Ind., n.724, p.17-20, 2006.

RANGANA, S., Manual of analysis of fruit and vegetable products. New Delhi: Tata McGrAa- Hill, Publishing Company Limited, p. 94-95, 1979

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B., COURI, S. e CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.

SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese apresentada ao Programa de Pós-

Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Natal, RN. 2007.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chemistry*, v. 133, n. 15, p. 1299-1304, 2012.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, capítulo 1, p. 85-95, 1996

SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall; 2 edition p.576, 2001.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise dos Alimentos (Métodos químicos e biológicos)*. 3a. ed., Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 235p. 2002.

SILVA, M. M.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, M. M. Demanda energética envolvida no processo de dessecção de umidade em polpa de manga. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. v. 4, p. 107-117, 2002.

SOUZA, R. L. A. Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2008.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.14, n.9, p.987–992, 2010.

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

UENOJO, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 388-394, 2007.

VIEIRA, P. A. F.; QUEIROZ, J. H.; ALBINO, L. F. T.; MORAES, G. H. K.; BARBOSA, A. A.; MÜLLER, E. S.; VIANA, M. T. S. Efeitos da inclusão de farelo do resíduo de manga no desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias. *R. Bras. Zootec.*, v.37, n.12, p.2173-2178, 2008.

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