View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

DISSERTAÇÃO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS AGRÍCOLAS

PRODUÇÃO DE PECTINASE EM FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA USANDO SUBSTRATO RESIDUAL DE LARANJA

MATHEUS SERRANO DE MEDEIROS

CAMPINA GRANDE – PB
MAIO - 2016

PRODUÇÃO DE PECTINASE EM FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA USANDO SUBSTRATO RESIDUAL DE LARANJA

MATHEUS SERRANO DE MEDEIROS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Área de Concentração: Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas

Orientadores: Flávio Luiz Honorato da Silva

Josivanda Palmeira Gomes

CAMPINA GRANDE – PB

MAIO - 2016

PRODUÇÃO DE PECTINASE EM FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA USANDO SUBSTRATO RESIDUAL DE LARANJA

Dissertação aprovada em _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Orientador - (DEQ/CT/UFPB)

_____

Profª. Drª. Josivanda Palmeira Gomes

Orientadora - (CTRN/UFCG)

_____

Prof. Dr. Dyego da Costa Santos

Examinador - (UFCG)

_____

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Muniz

Examinador – (UFPB)

MAIO - 2016

“Cada sonho que você deixa pra trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir. ”

Steve Jobs

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força e sabedoria, por ter me iluminado nesta trajetória longa e árdua que é a busca e a sedimentação do conhecimento.

Agradeço aos meus pais Fabíola e Inácio, que em toda minha vida, sempre me incentivaram e me apoiaram, aconselhando-me nos momentos de dificuldade e congratulando-me nas vitórias das nossas conquistas.

Agradeço a toda minha família, pessoas que são minha base emocional e moral, principalmente as minhas irmãs Isabelle e Mariana, a minha tia Natália, aos meus sobrinhos pela alegria da infância, aos meus tios Conceição e Mário pela acolhida e conselhos, aos meus sogros Esmeralda e Pedro.

Agradeço a minha esposa Patrícia por ter me ajudado do início ao fim desta empreitada, doando seu tempo e motivação para chegarmos até o fim.

Agradeço aos meus amigos, que despidos de vaidade e com muita humildade, fortaleceram minha trilha e tornaram mais agradáveis os momentos de dificuldade, principalmente meu amigo e conselheiro Dyego Costa, Siumara Alcântara pelos ensinamentos no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) e todos os que passaram neste longo período discente.

Agradeço veemente aos meus orientadores Flávio Luiz Honorato as Silva e Josivanda Palmeira Gomes pela orientação, amizade e ensinamentos.

Agradeço a Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química e aos amigos e professores do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola.

Agradeço a CAPES pela bolsa de incentivo.

Dedico esta dissertação a minha filha Maria Luiza, razão do meu viver.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....iii
LISTA DE TABELAS.....iv
RESUMO.....v
ABSTRACT.....vi
1. INTRODUÇÃO.....1
1.1. Objetivos.....3
1.1.1. Objetivo geral.....3
1.1.2. Objetivo específico.....3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....4
2.1. Citrus e laranja pêra.....4
2.2. Resíduos.....5
2.3. Enzimas.....7
2.4. Fermentação em estado semissólido.....8
2.4.1. Fatores que influenciam a FSS.....10
2.4.1.1. Umidade.....10
2.4.1.2. Temperatura e transferência de calor.....11
2.4.1.3. pH.....12
2.4.1.4. Aeração e transferência de oxigênio.....13
2.4.1.5. Tamanho da partícula.....13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....15
3.1. Local de realização da pesquisa.....15
3.2. Matéria prima.....15
3.3. Preparação do substrato.....15
3.4. Caracterização do resíduo.....18
3.4.1. pH.....18
3.4.2. Umidade.....18
3.4.3. Cinzas.....18
3.4.4. Pectina.....19
3.4.5. Teor de sólidos solúveis (°Brix) 20
3.4.6. Açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR) 20
3.4.7. Proteína bruta.....20

3.4.8. Granulometria.....21
3.4.9. Densidade aparente.....21
3.5. Processo fermentativo.....21
3.5.1. Microrganismo e inóculo.....21
3.5.2. Preparo do meio fermentativo.....22
3.5.3. Extração das enzimas.....22
3.5.4. Atividade poligalacturonase 23
3.6. Planejamento Experimental.....23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....25
4.1. Caracterização físico-química do bagaço seco da laranja.....25
4.2. Processo fermentativo.....28
4.3. Verificação das variáveis independentes sobre os picos das atividades enzimáticas observadas.....37
4.4. Verificação das variáveis independentes sobre as atividades enzimáticas observadas.....41
5. CONCLUSÕES.....46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Morfologia da laranja pêra 4

Figura 3.1. Processo de preparo da matéria-prima para produção da farinha do resíduo da laranja pêra..... 16

Figura 3.2. Fluxograma da preparação do substrato.....17

Figura 4.1 - Distribuição granulométrica do resíduo seco do bagaço de laranja onde 14 (1,180 mm), 20 (0,084 mm), 24 (0,710 mm), 35 (0,425 mm), 48 (0,300 mm), 60 (0,250 mm) e fundo (< 0,250 mm) 28

Figura 4.2. Diagrama de Pareto das variáveis umidade, nitrogênio e temperatura para a atividade enzimática da poligalacturonase 38

Figura 4.3. Superfície de resposta do pico de atividade de poligalacturonase em função dos valores codificados do nitrogênio e da fonte de Nitrogênio, fixando-se a variável umidade no nível +1 (60%) 40

Figura 4.4. Superfície de resposta para atividade poligalacturonase no tempo de 54 horas de fermentação, fixando a variável umidade no nível +1 (60%) 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Níveis das variáveis do planejamento experimental fatorial 22

Tabela 3.2. Matriz de planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central 22

Tabela 4.1. Valores médios e desvios padrão dos parâmetros físico-químicos do resíduo do bagaço de laranja 25

Tabela 4.2. Dados dos picos de atividade poligalacturonásica (U/g) para cada ensaio 29

Tabela 4.3. Dados do pH para cada ensaio e por tempo de fermentação 31

Tabela 4.4. Dados da atividade de AR para cada ensaio e por tempo de fermentação .. 33

Tabela 4.5. Dados dos teores de umidade (%) para cada ensaio e por tempo de fermentação 36

Tabela 4.6. Dados dos picos da atividade poligalacturonásica segundo planejamento experimental fatorial 2^3 37

Tabela 4.7. ANOVA para atividade poligalacturonásica 39

Tabela 4.8. Dados da atividade poligalacturonásica por tempo de fermentação 42

Tabela 4.9. Modelos empíricos para atividades PG em cada tempo de fermentação 43

RESUMO

A laranja pêra é uma das principais matérias-primas para a agroindústria brasileira. Da laranja pode-se extrair o suco, essências e o bagaço, este último sendo considerado um resíduo agrícola do processo da indústria de suco, onde representa em torno de 49,0% da composição da fruta, ou seja, aproximadamente a metade do total da produção de laranja destinada a produção de suco no Brasil. O objetivo deste trabalho foi o produzir pectinase através da fermentação semissólida, sendo utilizado como substrato o bagaço da laranja pêra em forma de farinha e como agente da fermentação um fungo filamentoso *Aspergillus niger* mutante CCT0916. O processo produtivo foi realizado com um planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais. Foram analisadas a influência das variáveis independentes: umidade (40, 50 e 60%); suplementação do meio com fonte de nitrogênio (1, 1,5 e 2%) e temperatura (25, 30 e 35 °C), utilizou-se como fonte de nitrogênio o sulfato de amônia, observando-se estas influencias na síntese de pectinase. A composição físico-química da farinha do bagaço apresentou umidade de 10,3% em b.u., cinzas de 2,562%, a distribuição granulométrica apresentou 58 % com grânulos de 0,841 mm proteína total de 3,428%, pectina de 4,25%, pH de 4,026, ART de 33,30%, AR de 17,867%, sólidos solúveis de 40 °Brix e densidade 0,658 g/mL. O quarto ensaio (60% de teor de água, 2,0% de N e 25 °C) foi o que melhor apresentou atividade poligalacturonásica, nas condições de 60% de umidade, 2% de suplementação de fonte de nitrogênio e 25 °C de temperatura, obtendo-se 18,78 U/g, ratificando o modelo estatístico da superfície de resposta que apresentou produção de atividade poligalacturonásica de 16 U/g.

Palavras-chave: *citrus sinensis* (L.) Osbeck var. pera, resíduo agroindustrial, *Aspergillus niger* CCT0916, poligalacturonase

.

ABSTRACT

Orange - Pear is one of the main raw materials for the Brazilian agribusiness. This fruit extract the juice, and bagasse essence, the latter being considered a waste product of the juice industry process , which is around 49.0% of the fruit composition , approximately half of the total production orange intended for juice production in Brazil. The objective of this work was to study the production of pectinase through semisolid fermentation is used as a substrate pulp of the orange - pear shaped flour and as a leavening agent of a filamentous fungus *Aspergillus Niger* mutant CCT0916 .Through the experimental design 2^3 with three central points , the data were analyzed using Statistica 7.0 statistical software , we analyzed the influence of independent humidity variables (40, 50 and 60%) , the medium supplemented with a nitrogen source (1, 1.5 and 2%) and temperature (25, 30 and 35 °C) was used as the nitrogen source ammonium sulfate. The physical and chemical composition of bagasse flour showed moisture of 10.3% wb, ash 2,562%, 3,428% total protein, pectin 4.25%, pH 4,026, ART 33.30%, AR 17.867 % soluble solids of 40° Brix and density 0,658 g / ml. The four test was the best presented polygalacturonase activity under the conditions of 60% moisture content, 2% nitrogen source of supplementation and 25 °C, yielding 18.78 U/g , confirming the statistical model of surface response which features production polygalacturonase activity of 16 U/g .

Key-words: *citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Pera, agroindustrial waste, *Aspergillus niger* CCT0916, polygalacturonase

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira produz mais de 18 milhões de toneladas de laranja, cerca de 30% da safra mundial da fruta, sendo responsável por cerca de 60% da produção mundial de suco de laranja, o Brasil é também o campeão de exportações do produto. O cultivo de laranja no Brasil se divide em dois períodos distintos, o primeiro, de 1990 a 1999, se caracteriza pelo aumento da produção e conquista da posição de líder do setor. O segundo, a partir de 1999, é o período de consolidação da capacidade e desempenho produtivo (MAPA,2016)

São Paulo e Flórida dominam a oferta mundial, e essa grande concentração em dois locais de produção é algo raro em se tratando de *commodities* agrícolas. O sistema agroindustrial citrícola movimenta cerca de 9 bilhões de reais por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. Inovações em pesquisa, tecnologia e logística estão na base da eficiência e liderança do Brasil (NEVES e LOPES, 2005).

Como toda atividade seja agroindustrial ou industrial geram resíduos, é importante haver um processo sustentável para reaproveita-lo. A disposição de resíduos no meio ambiente deve ocorrer após o tratamento dos mesmos, adequando-os aos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (AQUARONE et al., 1990). Esta iniciativa, em geral, demanda investimentos significativos e não são acessíveis aos pequenos e médios produtores e comerciantes. Os resíduos gerados pela indústria de alimentos possuem alto valor de reutilização. Dessa forma, nos últimos anos, uma atenção especial vem sendo dada para a minimização ou reaproveitamento destes nos diferentes processos industriais. Estes resíduos envolvem quantidades apreciáveis de casca e caroço que, além de fonte de matéria orgânica, servem também como fontes de produção de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento como, por exemplo, em processos fermentativos (COELHO et al., 2001). A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia. Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na tendência do uso da fermentação semissólida (FSS), para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de macromoléculas vegetais complexas (COUTO e SANROMÁN, 2005).

O uso da fermentação semissólida tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes

microrganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela fermentação semissólida (FSS) são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HÖLKER et al., 2004).

Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FSS está relacionada ao menor volume de efluente produzido e à possibilidade de conduzir o processo em condições de quase esterilidade. Outra vantagem de destaque da FSS é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, servindo estes como fontes de carbono e energia (FARINAS et al., 2008).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Produzir pectinases através de fermentação semissólida, usando como substrato a farinha do bagaço da laranja seco e como agente da fermentação o microrganismo *Aspergillus niger* CCT 0916.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar quanto a parâmetros físicos e químicos o substrato (umidade, densidade aparente, pH, cinzas, proteína total, pectina, açúcares redutores, açúcares redutores totais, sólidos solúveis totais - ºBrix;
- Avaliar a influência da umidade, temperatura de fermentação, fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) sobre a atividade de poligalacturonase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Citrus e laranja pêra

De origem asiática, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia. Entretanto aqui, com melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, as citrinas se expandiram para todo o país. Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero Citrus e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae, representado, na maioria, por laranjas (Citrus sinensis), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (LOPES et al., 2011). A Figura 2.1 encontra-se a morfologia da laranja pêra

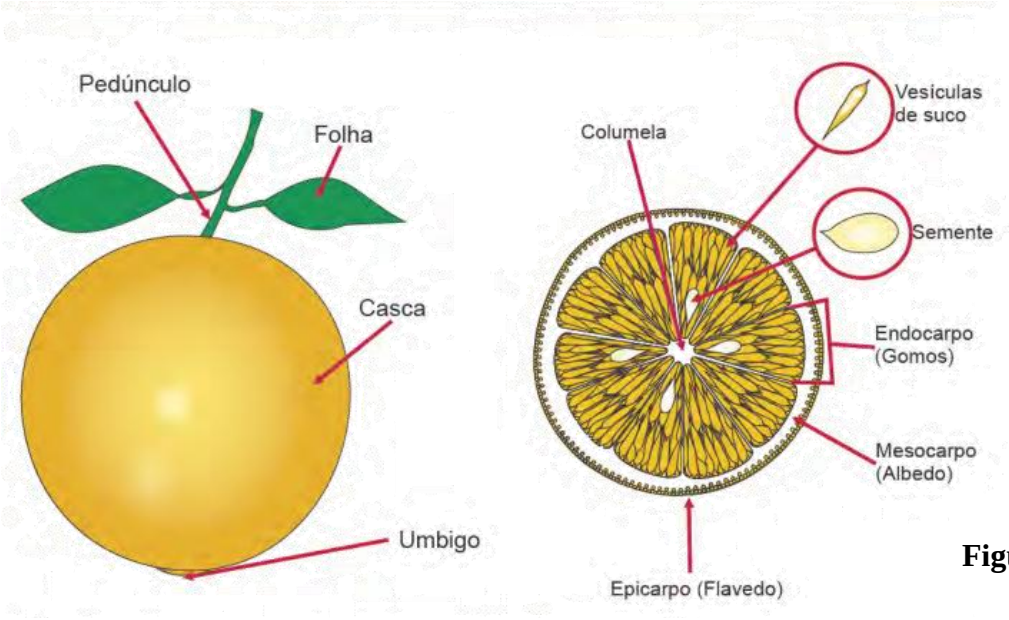

Figura 2.1. Morfologia da laranja pêra

Fonte: Adaptado de Borges Filho (2011)

No Brasil a primeira introdução foi feita pelos portugueses, no começo do século XVI, por volta de 1530, quando teve início a colonização (OLIVEIRA et al., 2012). As condições climáticas do sudeste e nordeste brasileiros propiciaram boas condições para vegetação e produção do que nas próprias regiões de origem. Assim, as plantas cítricas

se expandiram para todo o País, sendo as vezes até mesmo consideradas erroneamente como nativas. Naturalmente, com o aumento da população e do consumo, foram sendo plantadas por toda a parte, em pequenos pomares caseiros e pomares comerciais (DONADIO et al., 2005).

É relatado na literatura que a composição química dos frutos cítricos é afetada pela localização em que o fruto está posicionado na árvore, pois este fruto sofrerá a influência sendo nutrido em um galho mais vigoroso ou um galho mais fino, relação cultivar copa e porta-enxerto (cavalo) (ESPINOZA-NUNEZ et al., 2008), nutrição mineral (DUENHAS et al., 2002), além de fatores climáticos (DETONI et al., 2009). A laranja 'Pêra', *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, é a mais importante variedade copa cultivada no Brasil. Sua origem é incerta, mas é provável que tenha derivado da laranja 'Berna' ou 'Verna Peret', da Espanha (SALIBE et al., 2002).

2.2. Resíduos

Os resíduos agroindustriais são gerados durante o processamento industrial agrícola ou de produtos de origem animal. Os derivados de atividades agrícolas incluem materiais como palha, caule, folhas, casca, fibra, semente, polpa, bagaço de laranja, legumes, cascas de cereais (arroz, trigo, milho, sorgo, cevada), bagaço de cana-de-açúcar, e muitos outros.

Estes resíduos são gerados em grandes quantidades ao longo do ano e são os recursos renováveis mais abundantes na Terra. Eles são compostos principalmente por açúcares, proteínas, fibras, sais minerais, que são compostos de interesse industrial. Devido à grande disponibilidade e composição rica em compostos que podem ser utilizados em outros processos, existe um grande interesse sobre a reutilização destes resíduos, tanto do ponto de vista econômico como do ambientais, no aspecto econômico baseia-se no fato de tais resíduos poderem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo para a produção de outros compostos de valor agregado, com a expectativa de reduzir os custos de produção. A preocupação ambiental é porque a maioria dos resíduos agroindústrias possuem compostos fenólicos e outros compostos de potencial tóxico, o que pode causar deterioração do ambiente quando os resíduos são descarregados para a natureza (MUSSATO et al., 2012)

O aumento da população mundial, bem como da poluição ambiental tem criado a necessidade da utilização eficiente e do aproveitamento integral dos recursos agrícolas. O Brasil, país com intensa atividade no setor de produção primário, gerando anualmente quantidades significativas de resíduos agroindustriais (VILLAS BÔAS, 2001 apud ALBUQUERQUE et al., 2003).

Os resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros componentes (COELHO et al, 2001).

A crescente preocupação com o meio ambiente incentiva à viabilização de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. A indústria de alimentos produz uma série de resíduos com alta capacidade de reutilização. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda se agrega valor aos produtos do mercado (PELIZER et al., 2007).

O aproveitamento de matérias-primas vegetais regionalmente adaptados é fundamental para a melhora da oferta de alimentos que possam substituir, parcial ou totalmente, alguns componentes básicos na composição das rações animais. Entretanto, no caso de frutos tropicais tem-se observado grande desperdício de subprodutos resultantes do beneficiamento com excelente potencial para utilização na alimentação animal, como é o caso do caju (RAMOS et al., 2006).

Com o crescimento constante das agroindústrias da fruticultura no Nordeste brasileiro, a utilização de subprodutos do processamento destaca-se como uma alternativa na alimentação animal. Vale ressaltar que, apesar deste crescimento, os subprodutos agroindustriais ainda são pouco utilizados, podendo tornar-se poluentes ambientais (TELES, 2006).

Os resíduos agroindustriais, bagaços de frutas tropicais, por exemplo, representam um elevado potencial de uso para conversão proteica por microrganismos, pois possuem baixo valor de proteínas (base seca), boa quantidade de carboidrato (açúcar e amido) que podem ser metabolizados como fonte de energia para reações de biossíntese (HOLANDA et al., 1997).

A conscientização da importância do uso de materiais biológicos como matérias-primas renováveis para a obtenção de energia, produtos químicos e alimentos, assim como a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e florestais como matérias-primas de custo reduzido em fermentações semissólidas, reavivou o interesse por esta forma de cultivo (HESSELTINE, 1972). A fermentação semissólida (FSS) está,

atualmente, sendo muito utilizada para reaproveitamento destes materiais, com objetivo produção de enzimas (CAMPOS et al., 2005).

Diversos coprodutos têm sido usados com sucesso para o enriquecimento proteico por fermentação microbiana entre eles: resíduos de batata doce, bagaço de laranja, resíduos de mandioca, beterraba forrageira, bagaço do pedúnculo do caju, bagaço de maçã etc. O enriquecimento proteico se destina muitas vezes para produção de ração animal (CAMPOS et al., 2005).

De acordo com a base de dados estatísticos da Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAOSTAT), a produção mundial de laranja em 2007 foi estimada em 63.906.094 toneladas. Uma percentagem elevada desta produção (70%) é utilizada para a fabricação de produtos tais como o suco ou geleia. Além disso, cerca de 50 a 60% dos frutos tratados é transformada em resíduo, que é composta da casca, as sementes e os resíduos de membrana (WILKINS et al., 2007).

Após o processamento industrial da manga, suas sementes e cascas são descartadas, representando até 60% do peso total da fruta e gerando grande quantidade de resíduos (VIEIRA et al., 2009).

A utilização desses subprodutos regionais visa o aproveitamento de matérias-primas da produção agrícolas local. Na região nordeste o cajueiro é uma planta largamente cultivada, principalmente no Ceará, o pedúnculo deste fruto é descartado, pois o maior valor dessa cultura está associado a amêndoa. Considerando-se que o pseudofruto corresponde a 90% do peso do caju (LEITE, 1994); no entanto, segundo alguns estudos, em média somente 5 a 15% desse total são aproveitados industrialmente ou para consumo in natura, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento, feito para a indústria de beneficiamento de castanha (COSTA, 1999; CAMPOS et al., 2005).

2.3. Enzimas

As enzimas são componentes de todos os tipos de células, animal, vegetal e microbiana. Os organismos superiores foram os primeiros utilizados como fontes de enzimas. O efeito do amaciamento da carne por mamão (papaína) levou a um expressivo cultivo da planta com propósito de produzir a enzima papaína da família das proteases. Outras enzimas são extraídas de órgãos animais, como, tripsina e

quimotripsina do pâncreas de porco. Essas fontes apresentam algumas desvantagens tais como: o tecido utilizado na extração da enzima pode sofrer limitações de suprimento quando a demanda aumenta, requer cultivos de grandes áreas e estão sujeitas a intempéries (COURI, 1993).

As enzimas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. As seis classes representativas das enzimas industriais são: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. A produção e uso de enzimas tem se tornado uma área de grande interesse da indústria biotecnológica. As enzimas têm sido usadas pelo homem por vários séculos, mesmo antes do conhecimento de sua natureza. A fabricação de queijo usando estômago de bezerro como um catalisador foi provavelmente o primeiro exemplo, sendo seu uso tão antigo que a data de seu descobrimento é desconhecida (SANTOS, 2007).

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

A tecnologia enzimática é, hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agridem o meio ambiente e provocam o desgaste de materiais. Muitos tratamentos químicos são realizados em altas temperaturas e pressões, utilizando ácidos fortes ou álcalis que significam perigo ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente (BON, 2002; MITIDIERI et al., 2002).

2.4. Fermentação em estado semissólido

A fermentação em estado semissólido (FSS) consiste no crescimento microbiano e a formação de produto em partículas sólido, na ausência (ou quase ausência) de água,

no entanto, o substrato contém umidade suficiente para permitir o crescimento do microrganismo e do metabolismo (PANDEY, 2003).

O termo fermentação semissólida (FSS), ou em estado sólido (FES), ou fermentação em meio semissólido referem-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 (DEL BIANCHI et al., 2001).

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

Daniel et al. (1996) afirmaram que caracterizar a fermentação semissólida, via de regra, leva a uma comparação com a fermentação submersa, para uma melhor compreensão do processo. A fermentação em meio semissólido apresenta vantagens sobre a fermentação submersa por ter um custo de produção mais viável, devido à pequena exigência energética e à facilidade na extração dos produtos.

As fermentações submersas (FS) incluem uma variedade grande de processos microbianos na qual a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido. Murthy et al. (1993) descreveram que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se à utilização, na FES, do substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FS, em que se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Gervais e Molin (2003) relataram que a principal diferença entre a FS e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As fermentações em estado semissólido são reações de mistura perfeita nas quais, em teoria, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos, nutrientes e metabólitos. No entanto, nos cultivos em meio sólido, encontram-se sistemas com alta viscosidade, sendo que, para se chegar à homogeneidade, seria necessária excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular (PALMA, 2003).

Os resíduos de processos agroindustriais podem ser usados como substrato para crescimento microbiano, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte

de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (MAHMOOD et al., 1998).

2.4.1. Fatores que influenciam a FSS

A qualidade do produto obtido está relacionada com fatores que irão determinar o processo fermentativo que são a aeração e transferência de oxigênio, temperatura e transferência de calor, atividade de água e umidade e a escolha adequada do microrganismo e do substrato.

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. O baixo conteúdo de umidade na FES possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato usado quando comparado com a FS e, também, 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 (DOELLE et al., 1992).

Segundo Gutierrez Rojas et al. (1998) todos os processos de fermentação em estado sólido, necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, separação em alguns casos e a purificação dos produtos.

2.4.1.1. Umidade

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do micro-organismo. 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. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE et al., 1985).

A água apresenta um papel primordial na FES, pois é a responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser

constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY et al., 2003).

Para cada espécie de micro-organismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, enzimas. Esta constatação foi feita por Narahara et al. (1982) que estudaram o efeito da umidade do substrato sobre a atividade de proteases e amilases produzidas por *Aspergillues oryzae*. Os autores observaram, que as atividades específicas diminuíram nos cultivos realizados com o substrato mais úmido, condição que, no entanto, foi favorável ao crescimento celular. Os autores concluíram que há um valor de umidade ótimo para a produção de enzimas em substratos sólidos o qual, não necessariamente coincide com o valor correspondente para a obtenção da máxima concentração celular. Assim, o controle da umidade do sistema pode aumentar as produtividades enzimáticas nas Fermentações Semissólidas. Han et al. (1987) confirmam esta conclusão mostrando, em seu trabalho que, a mínima umidade necessária para o crescimento de *Aspergillus ficuum* não é a mesma para produção de fitase, no cultivo em estado sólido, a partir de grãos de cereais e sementes de leguminosas (PALMA, 2003).

De acordo com Correia (2004), o preparo e a seleção do substrato devem levar em conta os níveis de atividade de água e umidade ideais. A adição de água ou solução de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo.

2.4.1.2. Temperatura e transferência de calor

Os processos fermentativos em estado sólido caracterizam-se por serem exotérmicos. Durante a fermentação em estado semissólido grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do micro-organismo. 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).

No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, são os mesmos em qualquer ponto do leito. No entanto, com o progresso da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam, fato que, por sua vez, libera calor, o qual não é facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução feita pelo leito da fermentação. Sendo assim, são formados gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos dependendo dos parâmetros de controle do sistema. Nesse caso podem ser formadas zonas de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio, que afetam negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (PALMA, 2003).

DEL BIANCHI et al. (2001) apresentam a taxa de produção de proteínas por *Aspergillus niger* em relação à temperatura empregada no processo. Estes autores observaram que a temperatura de 40 ºC apresentou menor tempo na fase *lag*, mas a 35ºC obteve maiores valores de produção de proteína. Para a temperatura equivalente a 45ºC houve uma perda sensível na eficiência do processo.

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's, não é fácil de ser realizado (PANDEY et al., 2003).

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparado a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Entretanto, a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos microambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (PALMA, 2003). Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a

adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI et al., 2001).

2.4.1.4. Aeração e transferência de oxigênio

Correia (2004) citou que a aeração cumpre funções básicas como: manter condições aeróbicas; eliminar o dióxido de carbono formado; regular a temperatura do substrato; ajustar o nível de umidade.

Os sistemas de FES 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.

Del Bianchi et al. (2001) relataram que há diferentes maneiras para se obter uma movimentação do ar por entre o substrato, permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio, quer seja pela utilização do material poroso medianamente granulado ou fibroso, pelo uso de pequena espessura da camada de substrato, pela utilização de bandejas perfuradas ou reatores com fundo de tela de arame, pela agitação do substrato ou ainda pela introdução de ar forçado estéril dentro do reator.

A passagem de ar pelo 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, que a pressão osmótica do meio aumente e acelere o processo de esporulação. Para controlar ou minimizar este problema, o ar deve ser saturado em vapor de água ou próximo da saturação (SANTOS, 2007).

2.4.1.5. Tamanho da partícula

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 e podendo resultar em pouco crescimento. Ao contrário, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, porém limitam a superfície para ataque microbiano. Isto necessita um tamanho de partícula para um processo particular (PANDEY et al., 2003). 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 têm sido frequentemente usadas em FSS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização da pesquisa

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) em conjunto com o Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA) ambos pertencentes à Universidade Federal de Campina Grande, Campus I, Campina Grande, PB.

3.2. Matéria prima

As laranjas variedade Pêra da safra 2011 foram obtidas na Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas (EMPASA) de Campina Grande, Paraíba.

3.3. Preparação do substrato

Na Figura 3.1 encontra-se o processamento para produção do: resíduos da laranja pêra, observa-se a sequência dos seguintes processos:

- Recepção: As laranjas foram recepcionadas no LAPPA, sendo desensacada sobre uma bancada;
- Seleção: Foram removidas sujeiras como galhos e folhas e selecionadas as laranjas maduras de acordo pela coloração mais amarelada;
- Lavagem: As laranjas foram lavadas em água corrente para a remoção de impurezas sólidas de sua superfície;
- Higienização: As laranjas foram higienizadas em imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 2 % em baldes de 10 litros;
- Extração do suco: As laranjas foram cortadas ao meio, e processadas em um espremedor de laranja doméstico de Marca MONDIAL, modelo Premium.
- Fatiamento do resíduo: O resíduo da laranja foi cortado em pedaços menores e assimétricos.

Figura 3.1. Processo de preparo da matéria-prima para produção da farinha do resíduo da laranja pêra

Na Figura 3.2 encontra-se o procedimento realizado para a produção da farinha do bagaço, onde se verifica que após a chegada do material no laboratório, as laranjas

foram recepcionadas, selecionadas, lavadas, higienizadas com uma solução de hipocloreto de sódio a 2% pelo tempo de 15 minutos, em seguida a matéria-prima foi repartida com uma faca em duas partes para poder ser extraído o suco, neste processo utilizou-se um espremedor de laranjas elétrico da marca MONDIAL modelo Premium. Após a extração sobrou somente a casca, albedo, sementes e o bagaço da laranja, a casca foi cortada com uma faca em pedaços menores. Obtido o bagaço da laranja, foi utilizado um moedor manual para diminuir as partículas da matéria-prima, sendo em seguida o produto levado a estufa a 55 °C por 48 h. Utilizou-se um moinho de facas da marca Tecnal para transformar o material seco em farelo. A matéria-prima (resíduo) para o estudo foi armazenada em recipiente escuro com capacidade para 1 quilograma e hermeticamente fechado.

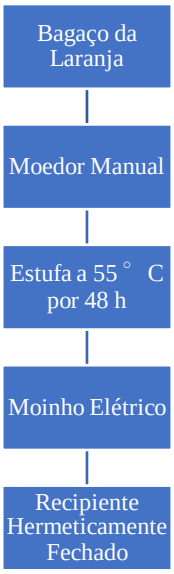

Figura 3.2. Fluxograma da preparação do substrato

3.4. Caracterização do resíduo seco

Para a caracterização foram determinadas a granulometria do resíduo seco, densidade aparente, pH, cinzas, umidade, sólidos solúveis °Brix, açúcares redutores totais (ART), açúcares redutores (AR), pectina e proteína total, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.4.1. pH

O pH foi medido segundo a metodologia descrita em Brasil (2005). Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g da amostra sólida. Após completa homogeneização, seguida de filtração, foi realizada a medida do pH em potenciômetro digital.

3.4.2. Umidade

Para análise da umidade seguiu-se o procedimento de Brasil (2005), a partir da diferença de massa entre a amostra úmida e a seca. Pesou-se 1 g da amostra em recipientes já tarados, deixando secar em estufa a 105 ºC. Após 24 h de secagem, as amostras foram colocadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida pesados em balança analítica. Utilizou-se a Eq. 1 e o resultado foi expresso em porcentagem.

$$Umidade\ (\%) = \frac{(massa\ inicial - massa\ final)}{massa\ inicial} x\ 100, \qquad (1)$$

3.4.3. Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada conforme metodologia descrita em Brasil (2005). Os cadinhos de porcelana vazios foram colocados na mufla e deixados a 550 °C. Depois foram deixados em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesados vazios e com 1 g da amostra. Foram levados a mufla a 550 °C, durante cinco h, até obter

uma cinza de cor clara. Após este tempo foram novamente deixados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem (m/m).

3.4.4. Pectina

A determinação de pectina foi baseada no procedimento de Rangana (1979) onde se utilizou um Becker de 1000 mL para pesar 20 g da amostra, em seguida adicionou-se 400 mL da solução de HCL 0,05 N para posteriormente se aquecido por 2 h, completando-se a água perdida por evaporação para manter o volume inicial. Aguardou-se o resfriamento da solução até a temperatura ambiente, em uma proveta de 500 mL, colocou-se esta solução e completando-a com água destilada. Logo em seguida filtrou-se a solução com o auxílio de algodão, aferiu-se o filtrado em proveta de 200 mL e transferiu-se para um Becker de 100 mL. Nesta mistura, adicionou-se 250 mL de água destilada, neutralizou-se a solução com NaOH 0,1 N com a ajuda do pHmetro, a seguir foi adicionado 10 mL de NAOH 1N em excesso, com agitação constante. Aguardou-se 15 h em repouso.

No dia subsequente, adicionou-se 50 mL de ácido acético 1 N, aguardou-se 5 min para acrescentar 25 mL de solução de cloreto de cálcio 1 N com agitação. Aqueceu-se a solução a ebulição por 2 min e esperou-a repousar por 3 L. Em seguida filtrou-se esta solução por meio de papel filtro preparado anteriormente.

Umidificou-se o papel de filtro com água destilada e secou-o em estufa a 105 °C por 2 h. Retirou-se o papel da estufa e aguardou-se o resfriamento do mesmo em dessecador com sílica gel e pesou-o. O precipitado foi lavado com água destilada fervente até o mesmo ficasse livre de cloretos, para a constatação da presença destes cloretos na porção retida no papel filtro, fez-se um teste usando-se uma solução de nitrato de prata a 1%, onde acrescentou-se 1 mL desta solução no filtrado, por fim, o filtrado estando livre de cloretos, o líquido não tornasse turvo. Secou-se o papel de filtro, o qual encontra-se o pectato de cálcio, em estufa a 105 °C até massa constante. Os resultados foram calculados através da Eq. 2 e expressos em porcentagem.

$$\%\ Pectato\ de\ cálcio = \frac{massa\ do\ pectato\ de\ cálcio\ x500}{mL\ do\ filtrado\ x\ massa\ da\ amostra} x100 \qquad (2)$$

3.4.5. Sólidos solúveis (ºBrix)

A leitura dos sólidos solúveis °Brix foi feita de forma direta em refratômetro portátil, segundo o procedimento descrito em Brasil (2005). Utilizou-se 1 g da amostra para 20 mL de água destilada. Esta suspensão foi homogeneizada, deixada em repouso por 30 min, filtrada, e então realizada a leitura. O resultado foi multiplicado pelo fator de diluição para obter o °Brix.

3.4.6. Açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR)

A quantificação dos grupos redutores foi realizada com base na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O procedimento adotado foi o descrito por Miller (1959).

Para a determinação dos açúcares redutores, dissolveu-se determinada quantidade de amostra em um volume definido de água. Depois transferiu-se 1 mL para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. A seguir, os tubos foram levados para banho de água fervente por exatos 5 min. Após este intervalo, os tubos foram resfriados. Em cada tubo foi adicionado 8 mL de água destilada e feita à leitura imediatamente em espectrofotômetro a 540 nm.

A determinação de açucares redutores totais (ART) das amostras foi determinado pelo método de DNS conforme metodologia adaptada por CORREIA (2004). Após a diluição, foi realizada a hidrólise ácida da amostra com adição de ácido clorídrico (HCl) 2 N, seguida de aquecimento. Neutralizou-se essa solução acrescentando solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 N. Depois foi seguida a mesma metodologia utilizada em açúcares redutores.

3.4.7. Proteína bruta

O teor de proteína foi determinado utilizando-se o método semi-micro Kjeldahl com adaptação para UV-visível a 410 nm, de acordo com a metodologia de Silva (1998).

3.4.8. Granulometria

A distribuição granulométrica foi feita utilizando-se 100 g do material colocados em conjunto de peneiras Produtest com 14, 20, 24, 35, 48 e 60 mesh e agitados na frequência nove do agitador mecânico por um tempo de 20 min, conforme a NBR – 7181 (ABNT, 1984). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação ao peso total do material**.**

3.4.9. Densidade aparente

Para a determinação da densidade foi utilizado 100 g de matéria, que foi colocado em uma proveta, para que fosse aferido o volume destas 100 g, sendo este despejado na proveta sem que houvesse compactação (BRASIL, 2005).

$$Densidade\ aparente = \frac{massa(g)}{volume\ ocupado\ (cm^3)} \quad (3)$$

3.5. Processo fermentativo

3.5.1. Microrganismo e inoculo

O microrganismo utilizado foi um fungo filamentoso da linhagem *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza - CE, cultivado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG), em tubos de ensaio com tampas rosqueadas contento solo estéril e estocados a -18 °C. Os conídios foram ativados em duas etapas, usando um meio básico conforme COURI (1993), composto por pectina cítrica (10 g/L), $NaNO_3$ (3 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $MgSO_4$ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), $FeSO_47H_2O$ (0,01 g/L) e Agar-agar (20 g/L), sendo transferidos do solo para este meio com alça de platina e incubados por cinco dias em estufa a 30 °C. Este foi denominado de primeiro repique. Partindo deste repique, foi obtido o segundo repique. O esporo do segundo repique foram utilizados para obtenção de grande quantidade de esporos no meio de sabugo de milho. Cada repique pôde ser mantido sob refrigeração por um período de quatro meses e seguindo este procedimento cada suspensão de conídios no solo somente pôde ser usada 4 ou 5

vezes, e depois descartada. Nos frascos de sabugo com esporos foram adicionados 40 mL de solução 0,3% v/v de Tween. Após agitação os esporos foram transferidos para erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inoculo de 10^7 esporos por grama de substrato sólido.

3.5.2. Preparo do meio fermentativo

As fermentações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do substrato úmido. A suplementação do substrato com a fonte de nitrogênio foi realizada adicionando sulfato de amônio nas concentrações pré-estabelecidas na Tabela 3.1. No volume de água a ser adicionado ao resíduo, diluiu-se o sulfato de amônio, obtendo-se as concentrações a serem estudadas no planejamento.

Os erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão envolvido com gaze e auto clavados por 5 min a 0,5 atm. Para realização das fermentações, o meio contido nos erlenmeyers foi inoculado com o microrganismo na concentração de 10^7 esporos/g de resíduo úmido e incubados em estufa úmida a 30 ºC, sendo esta a temperatura média anual da região e também favorável ao desenvolvimento do microrganismo. A umidade relativa dentro da estufa durante o processo fermentativo foi mantida pela evaporação da água contida em um recipiente colocado dentro da estufa. Durante o processo, o nível da água era restabelecido. As amostras foram retiradas periodicamente durante o processo (0, 5, 21, 29, 46, 54, 70, 78 h de fermentação), determinando-se o pH, a umidade e os açúcares redutores, segundo a metodologia descrita nos itens 3.4.1, 3.4.2, 3.4.6.

3.5.3. Extração das enzimas

O procedimento para a extração do extrato enzimático foi baseado no realizado por Castilho (1997). Para cada tempo de fermentação, após retirar as amostras para as análises, foi adicionado em cada erlenmeyer 5 mL/g de meio fermentado de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5. Após homogeneização, os erlenmeyers foram deixados por 1 hora em banho termostático a 30 ºC. Decidiu-se trabalhar com um tempo

de contato maior que o utilizado por Castilho (1997) uma vez que foram utilizados sistemas sem agitação. O extrato bruto obtido foi filtrado em algodão. O extrato enzimático foi armazenado em tubos de ensaios e congelado em freezer para o aferimento posterior da atividade enzimática.

3.5.4. Atividade poligalacturonase

A medida da atividade poligalacturonásica foi determinada conforme Couri (1993) adaptado por Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza/CE. Em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25% m/v, preparado em tampão acetato 200 mM pH 4,5, previamente aclimatado em banho termostático a 35 °C, adicionou-se 0,25 mL do extrato enzimático, seguindo a reação por 30 min a 35 °C. Após os 30 min, transferiu-se a 0,25 mL da mistura reacional para tubos contendo 1 mL do reagente DNS. Foi adicionada 0,75 mL de água destilada aos tubos, e em seguida foram aquecidos a 100 °C por 5 min. Depois de resfriados a temperatura ambiente, foram adicionados um volume de 8 mL de água destilada aos tubos, e após homogeneização, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Os ensaios foram realizados em triplicata, assim como os ensaios em branco, que são preparados segundo o mesmo procedimento acima, porém, o extrato enzimático é adicionado à solução de ácido poligacturônico e imediatamente transferido para os tubos contendo o DNS. Uma unidade de atividade poligalacturonásica corresponde a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido poligalacturônico por minuto de reação, nas condições do ensaio.

3.6. Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória. As variáveis dependentes foram a concentração da fonte de nitrogênio (sulfato de amônia), por ser este um nutriente importante no desenvolvimento microbiano, a umidade inicial (U) e a temperatura (T). Os valores adotados para as variáveis foram baseados nos valores estudados por Santos (2007) que estudou a influência da concentração da fonte

de nitrogênio (0, 0,5 e 1%) e da umidade (40, 50 e 60%) sobre a produção de pectinases utilizando pedúnculo do caju.

Os níveis das variáveis do planejamento experimental fatorial estão representados na Tabela 3.1. A matriz de planejamento está apresentada na Tabela 3.2, mostrando as variáveis utilizadas no planejamento suas codificações e os níveis. O planejamento fatorial foi analisado utilizando-se o software Statistica 7.0.

Tabela 3.1. Níveis das variáveis do planejamento experimental fatorial

Variáveis	Nível (-1)	Ponto central (0)	Nível (+1)
Umidade (% b.u.)*	40	50	60
Nitrogênio (% p/p)**	1,0	1,5	2,0
Temperatura (°C)	25	30	35

*Umidade inicial do meio; **Nitrogênio em concentração de sulfato de amônio

Tabela 3.2. Matriz de planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central

Ensaios	Umidade	Nitrogênio	Temperatura
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química da farinha do bagaço seco da laranja pêra

A caracterização do resíduo seco da farinha do bagaço da laranja obtido após a secagem e moagem da casca e albedo consta na Tabela 4.1. As análises foram realizadas em triplicata, com exceção da análise de granulometria que foi realizada apenas em um ensaio.

Tabela 4.1. Valores médios e desvios padrão dos parâmetros físico-químicos do resíduo da farinha do bagaço da laranja

Parâmetros analisados	Unidade	Valor
Umidade	(% em b.u.)	10,3 ±0,138
Cinzas	(%)	3,561 ±0,025
Proteína total	(%)	3,428 ±0,367
Pectina	(% pectato de cálcio)	4,253 ±0,288
pH	-	4,026 ±0,020
ART*	(%)	22,300 ± 1,07
AR**	(%)	17,867 ±0,327
Sólidos solúveis	ºBrix	40 ± 0,001
Densidade aparente	g/mL	0,658 ± 0,011

*ART - Açúcares redutores totais; ** AR - Açúcares redutores

Para a produção de enzimas como, por exemplo, pectinase, invertase, amilase, celulase e protease, é de importância vital a presença de nutrientes no substrato. Assim, a caracterização do resíduo seco da farinha do bagaço da laranja visou-se conhecer a composição dos resíduos com relação ao conteúdo de nutrientes, que são importantes na síntese das enzimas.

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas usando FSS minimiza a poluição e permite a obtenção de produtos de alto valor agregado a uma tecnologia econômica. Segundo o trabalho de Rodríguez-Jasso (2003) o bagaço da casca do limão é o principal subproduto sólido resultante da indústria de processamento de

limão que constitui cerca de 19,8% da massa seca de limão. Segundo os dados estatísticos da FAO, no México, a produção de limão em 2009 foi de cerca de 2 milhões toneladas. Ele dá uma estimativa de cerca de 396 mil toneladas de casca de limão produzidas por ano.

A umidade obtida com a secagem do resíduo do bagaço de laranja pêra foi de 10,3% em b.u., próxima ao valor encontrado por Ferrari et al. (2004) onde foi constatado o teor médio de 10,53% de umidade para o farelo desengordurado de semente de maracujá. Teor mais baixo de umidade foi aferida na farinha do bagaço da maçã, sendo de 5,14% de acordo segundo Protzek et al. (1998), sendo a temperatura de secagem maior que 55 °C utilizando 60 °C por 24 h, Oliveira Júnior et al. (2014) trabalhando com outro importante resíduo agrícola, o bagaço de coco verde obteve umidade do seu resíduo de 9,24%.

De acordo com Ruiz et al. (2012) a umidade do bagaço da casca de limão, que também é uma fruta cítrica, foi detectada em 7%, sendo inferior a encontrada no bagaço da laranja de 10,3%. Alcantara e Silva (2010) trabalhando com bagaço seco do pedúnculo de caju obtiveram uma umidade de 18,01%. Souza et al. (2010) trabalhando com resíduo de maracujá seco, verificaram valores de 13,04% de umidade em base úmida.

Chaves et al. (2004) relatam que as cinzas em alimentos se referem ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica, e que a composição das cinzas nada mais é que a quantidades das substâncias minerais presentes nos alimentos. Estes minerais podem influenciar o processo de fermentação pela disponibilidade de nutrientes para ser utilizado pelos microrganismos. O teor de cinzas deste trabalho foi de 3,561%, a cinza de qualquer resíduo terá uma variação de acordo com o tipo de variedade do fruto, tempo de plantio, tipo de nutrição que foi disponibilizada para a planta entre outros fatores edafoclimáticos,

Souza et al. (2010) utilizaram resíduo de maracujá e constataram 6,33% de cinzas enquanto Alcântara et al. (2013) trabalhando com casca do maracujá obtiveram 6,86% de cinzas, sendo estes dois últimos substratos ricos em minerais quando comparado ao resíduo de bagaço da laranja pêra, enquanto as cinzas do pedúnculo do caju (2,07%) apresentaram teor inferior ao presente neste trabalho. Em pesquisas realizadas com bagaço de coco verde, os pesquisadores encontraram teor de cinzas de

0,46% (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2014), sendo o menor valor encontrado dentre as literaturas citadas neste trabalho.

O teor de proteína total obtido foi de 3,428%, este valor ficou abaixo de outros trabalhos realizados com diferentes resíduos agroindustriais, como por exemplo, na farinha do bagaço de maçã os pesquisadores obtiveram o teor de proteína bruta de 5,79% (PROTEZEK et al., 1998), já a farinha do resíduo do pedúnculo de caju foi de 11,54% de acordo com Alcântara et al. (2007), no entanto o farelo da polpa cítrica mostrou-se mais rica em proteína com valor de 6,7% segundo trabalho de SCHALCH et al. (2001).

A presença de pectina no substrato é de extrema importância para a produção de poligalaturonase, pois a mesma é utilizada como indutor da síntese de pectinases de diversos microrganismos, foi constatado o teor de 4,253% de pectina para o resíduo de bagaço de laranja pêra, este valor é maior que teores relatados em farinhas de bagaço de coco verde de 1,64% (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2014) e polpa com casca de goiaba de 1,02% (MUNHOZ et al., 2008), no entanto foi inferior ao relatado por Alcântara et al. (2013), que na farinha do resíduo de maracujá encontraram 16,66% e do pedúnculo de caju 10,67%.

Couto e Canniatti-Brazaca (2010) encontraram na caracterização da polpa da laranja pêra um pH de 3,66 e sólidos solúveis (°Brix) de 10,60, sendo o pH deste trabalho de 4,026 mais alcalino do que o encontrado na literatura como também o nível de sólidos solúveis sendo superior ao relatado pelos autores.

Observando-se a Figura 4.1 da análise granulométrica do resíduo seco, verifica-se que de acordo com os dados apresentados, mais de 80% das partículas da massa do resíduo possuem tamanho entre 20 e 35 mesh, o que corresponde a valores de diâmetro entre 0,841 e 0,425 mm.

Sousa et al. (2010) trabalhando com resíduo seco da casca e albedo do maracujá amarelo, utilizado para a produção de pectinases, observaram que a granulometria apresentou 49% das partículas com tamanho entre 24 e 35 mesh, abaixo da granulometria do resíduo deste trabalho.

De acordo com Santos (2007), estudando a produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato, verificou-se nos resíduos secos que a granulometria apresentou cerca de 70% de partículas na faixa

de peneiras 20-35 Tyler que corresponde a dimensões entre 0,42-0,84 mm, semelhante ao encontrado neste trabalho (79,6%).

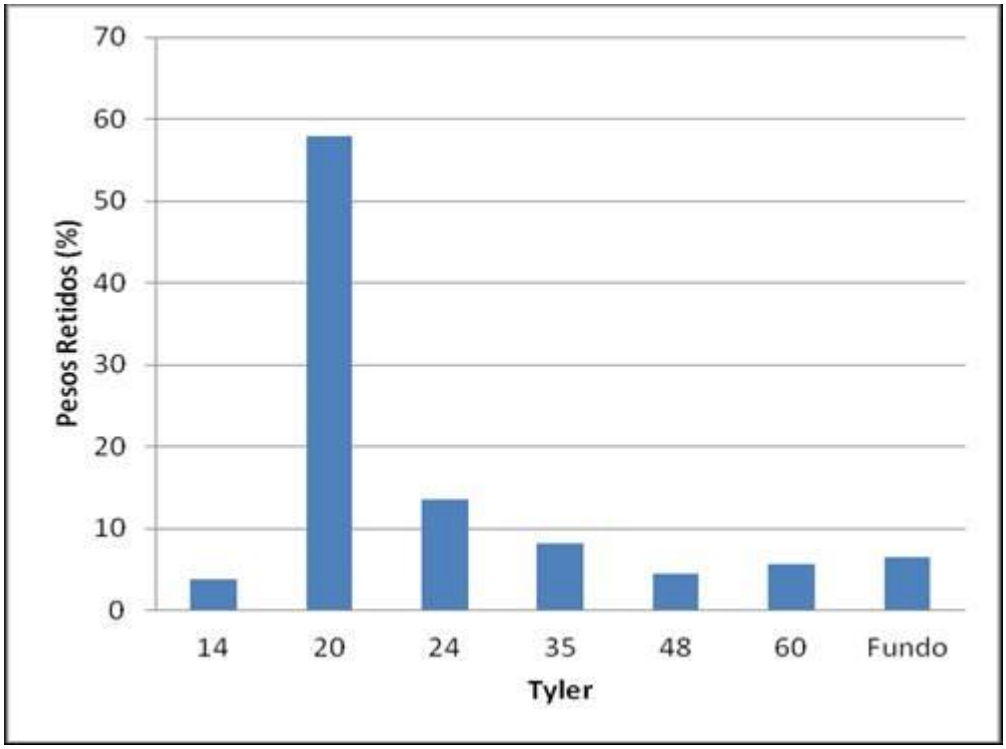

Figura 4.1 - Distribuição granulométrica do resíduo seco da farinha do bagaço de laranja onde 14 (1,41 mm), 20 (0,841 mm), 24 (0,710 mm), 35 (0,425 mm), 48 (0,300 mm), 60 (0,250 mm) e fundo (< 0,250 mm)

4.2. Processo fermentativo

Têm-se na Tabela 4.2. os valores médios da atividade poligalacturonásica para cada ensaio durante a fermentação semissólida da farinha do bagaço de laranja por *Aspergillus nig*er CCT 0916. Observou-se que após 5 h de fermentação, a atividade poligalacturonásica (PG) foi superior a 1,0 U/g apenas no experimento com menor umidade inicial (40%), maior fonte de nitrogênio (2%) e menor temperatura (25 °C), não sendo possível observar influência das variáveis de processo na atividade PG, para o período de tempo mencionado, visto que na maioria dos substratos de fermentação não foi detectado atividade PG. Às 21 h de fermentação foi detectada atividade PG em todos os substratos, sendo que os experimentos 8 e 10, compostos por meios com maiores umidade inicial (60%) e fonte de nitrogênio (2%) e níveis intermediários de

umidade inicial (50%) e fonte de nitrogênio (1,5%), revelando as maiores atividades PG, com valores absolutos superiores a 6,0 U/g. Para a faixa de tempo de fermentação compreendida entre 46-78 h constatou-se as maiores atividades PG, com picos de produção de 6,11 a 18,78 U/g, respectivamente para os experimentos 1 e 4. Segundo Coelho et al. (2001), o tempo de produção industrial máxima de pectinases situa-se entre 24 e 96 h, com o faixa encontrada neste trabalho estando incluída dentro do intervalo reportado pelos autores. Ao estudarem a produção de poligalacturonase por fermentação semissólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato, Souza et al. (2010) reportaram que a atividade PG começou a partir de 7 h de fermentação sendo atingido um pico de atividade igual a 20,9 U/g em 66 h de processo. Maciel et al. (2013) investigaram a produção de poligalacturonase por *Aspergillus nigri* em um reator de leito fixo usando-se cascas de laranja como meio de fermentação e observaram aumento das atividades de PG entre 48 e 96 h de fermentação. Santos et al. (2008a) produziram poligalacturonase por fermentação sólida do pedúnculo de caju seco, usando como agente da fermentação o microrganismo *A. niger* CCT 0916, e informaram que a atividade PG iniciou a partir de 7 h de fermentação, sendo que os maiores valores foram às 22 h de processo. Constatou-se que após 70 h de fermentação houve uma queda da atividade PG na maioria dos experimentos, provavelmente atribuída a ação proteolítica ou a instabilidade das moléculas enzimáticas durante o processo produtivo (COELHO et al., 2001).

Tabela 4.2. Dados dos picos de atividade poligalacturonásica (U/g) para cada ensaio

Tempo (h)	**Ensaios**										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
5	0,00	0,00	1,08	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96	0,56
21	1,26	2,10	1,38	0,76	5,06	5,15	2,11	6,43	5,50	7,14	4,80
29	1,99	7,59	3,12	1,40	3,95	3,81	2,92	6,39	5,09	6,74	4,77
46	3,0o	7,94	5,12	0,56	**10,85**	8,27	5,54	7,93	6,54	6,54	6,95
54	3,59	8,74	5,44	12,8	1,32	**9,8**	5,43	7,85	9,10	7,02	8,06
70	**6,11**	**9,19**	**5,61**	**18,78**	5,91	9,23	**6,56**	8,81	**7,63**	4,68	8,82
78	5,18	8,26	2,94	10,96	6,26	9,79	4,27	**9,21**	6,50	**11,03**	**10,32**

Observou-se ainda que os picos da atividade PG ocorreram de forma tardia na maioria dos experimentos (70-78 h), quando comparados com outros autores (SANTOS

et al., 2008a,b; CASTRO et al. 2009), o que pode estar relacionado à granulométrica do substrato utilizado, que teve a maior parte das partículas de 0,840 cm, relativamente grandes levando-se em consideração pesquisadores que utilizaram resíduos agroindustriais para produção de pectinases e relataram menor diâmetro dos grânulos (ALCÂNTARA et al., 2007; SOUZA et al., 2010). SOUZA et al. (2010) destacam que quando distribuídas nos reatores para a realização de fermentação em estado sólido, as partículas maiores promovem mais espaço entre partículas diminuindo, porém, o rendimento da absorção dos nutrientes pelo microrganismo, o que poderia resultar em adiamento da produção de pectinases. COELHO et al. (2001) estudaram produção de enzimas a partir de resíduos de cascas de coco verde com diferentes granulométricas (1,19 mm; 0,59 mm e <0,50 mm) e relataram que o pico de produção de pectinase foi tardia para o substrato com grânulos de maior tamanho quando comparado com aquele de menor diâmetro, sendo justificado pelos autores devido, provavelmente, a menor área interfacial específica do substrato de maior granulometria. Todavia, os picos de produção para os as partículas de maiores e menores diâmetros foram similares. Isso pode indicar que o tamanho das partículas constituídas por bagaço de laranja deste trabalho talvez tenha afetado apenas o tempo (h) de maior pico da atividade PG e não a produção enzimática avaliada.

Os valores médios de pH para cada ensaio durante a fermentação semissólida da farinha do bagaço de laranja por *Aspergillus nig*er CCT 0916 estão disponíveis na Tabela 4.3. A produção de pectinases por microrganismos é influenciada por inúmeros fatores, dentre os quais cita-se o pH (BRAVO et al., 2000), sendo assim, sua quantificação ao longo de processos fermentativos torna-se importante, uma vez que pode limitar o desenvolvimento do microrganismo inoculado e, consequentemente, reduzir o rendimento em termos de atividade poligalacturonásica. Além disso, Garzón e Hours (1992) destacaram que alterações nos valores de pH podem influenciar a atividade enzimática por meio de modificações conformacionais na molécula, proporcionando assim alterações no seu sítio ativo, resultando na redução ou no aumento da sua afinidade com o substrato. Observou-se que no início do processo de fermentação, todas as amostras apresentaram valores de pH próximos a 4,0, estando enquadradas dentro da faixa ótima para a maioria dos fungos que produz pectinases, que é de pH entre 3,5 e 5,5 (JAYANI et al., 2005). SANTOS et al. (2008a) produziram poligalacturonase por fermentação sólida do pedúnculo de caju seco, usando como

agente da fermentação o microrganismo *A. niger* CCT 0916, e observaram no início do processo pH de 4,5, semelhante aos deste trabalho. As diferentes concentrações de sulfato de amônio utilizadas não influenciaram o pH do meio, indicando que qualquer dose utilizada fornecerá pH em valor adequado para produção de pectinases. Houve uma tendência de redução do pH na maioria dos ensaios com o prosseguimento da fermentação semissólida da farinha do bagaço de laranja, podendo estar relacionado a liberação de ácido galacturônico no meio pela ação de enzimas pectinolíticas produzidas pelo microrganismo durante o processo (UENOJO e PASTORE, 2006). Todavia percebeu-se que os experimentos 1 e 7 apresentaram elevação do pH no início da fermentação, atribuída provavelmente a produção de componentes alcalinos durante o período de tempo mencionado, visto que quando o nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se menos ácido (CORDEIRO e MARTINS, 2009).

Tabela 4.3. Dados do pH para cada ensaio e por tempo de fermentação

Tempo (h)	**Ensaios**										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
0	4,09	4,12	4,16	3,97	3,94	4,12	4,12	4,08	4,12	4,15	4,13
5	4,31	3,96	4,13	3,95	3,84	4,11	4,21	3,95	4,05	4,11	4,11
21	4,2	3,73	4,12	3,86	3,78	3,38	4,15	3,95	3,46	4,01	4,04
29	4,16	3,28	4,1	3,76	3,74	3,33	4,04	3,94	3,16	3,9	3,91
46	4,13	3,42	3,94	3,55	3,82	4,05	3,97	3,68	3,45	3,76	3,44
54	4,08	3,54	3,77	3,46	3,8	3,92	3,88	3,33	3,66	3,67	3,38
70	3,97	3,6	3,04	3,25	3,77	3,87	3,49	3,46	3,78	3,03	2,87
78	3,95	3,42	3,84	3,37	3,71	4,35	3,44	3,56	3,94	3,04	2,97

Ao final dos processos fermentativos notou-se que os valores de pH finais apresentaram-se inferiores aos iniciais na maioria das amostras avaliadas, todavia permanecendo próximas à faixa ideal para o desenvolvimento de fungos produtores de pectinases. Para o experimento 6, observou-se grandes oscilações no pH, com esses valores decrescendo até 29 h de processo, com elevação no tempo de 46 h. Nos intervalos de 56 e 70 h o pH voltou a diminuir, entretanto percebeu-se elevação para nível próximo a 4,5 ao final da fermentação, sendo este valor superior ao encontrado no início do processo, o que pode indicar que nas horas finais de fermentação houve considerável consumo de nitrogênio orgânico pelo microrganismo. Por sua vez, o

experimento 11 revelou redução progressiva do pH em todos os tempos de fermentação, porém sendo obtido valor inferior a 3,0 nos tempos de 70 e 78 h, indicando que esta amostra produziu maior conteúdo de ácido galacturônico devido a ação enzimática.

Malvessi e Silveira (2004) investigaram a composição do meio e o pH na produção de poligalacturonase utilizando-se como substrato o farelo de trigo e como meio de fermentação o *Aspergillus oryzae* CCT3940 e observaram que o crescimento e desenvolvimento do microrganismo foi favorecido pelo pH próximo de 4,0, todavia sendo notada as maiores atividades com uma diminuição do pH para um valor ligeiramente abaixo de 3,0. Assim, mesmo estando fora da faixa ideal para a produção de pectinases, o pH do meio não afetou a atividade poligalacturonásica (Tabela 4.3.), estando em acordo com os resultados apresentados pelos autores citados. Em relação à temperatura, Jayani et al. (2005) afirmaram que a faixa ótima para o desenvolvimento da maioria dos fungos produtores de pectinases é entre 30 a 50 °C, todavia foi notado que o *A. niger*, mesmo na temperatura de 25 °C, manteve seu metabolismo reduzindo o pH do meio no final da fermentação, atingindo valores relativamente próximos aos dos experimentos nas temperaturas de 30 e 35 °C, e uma boa produção de pectinase (Tabela 4.2).

No estudo de Souza et al. (2010) foi constatada estabilidade da poligalacturonase obtida por fermentação semissólida do resíduo do maracujá com *A. niger* até temperatura de 50 °C, sendo mais evidente na faixa de 10 a 40 °C. Logo, temperaturas inferiores à faixa ótima de crescimento não afetariam a atividade poligalacturonase da farinha do bagaço de laranja.

Estão apresentados na Tabela 4.4. os valores médios dos açúcares redutores para cada ensaio durante a fermentação semissólida da farinha do bagaço de laranja por *Aspergillus nig*er CCT 0916. Durante o tempo de fermentação compreendido entre 5-21 h houve uma tendência crescente de elevação dos açúcares redutores na maioria das amostras, podendo estar relacionado à ação das enzimas pectinolíticas produzidas sobre o substrato, uma vez que tais enzimas podem favorecer a liberação de açúcares (UENOJO e PASTORE, 2007). Também deve ser considerado que os valores de pH abaixo de 4,5 podem ter favorecido a hidrólise de hidratos de carbono mais complexos presentes no bagaço da laranja em açúcares simples, de modo a ampliar os conteúdos de açúcares redutores. Ao produzirem poligalacturonase por fermentação semissólida utilizando resíduo do maracujá como substrato e o *Aspergillus niger* CCT 0916 como

agente da fermentação, Souza et al. (2010) constaram que até 22 h de processo houve aumento no conteúdo de açúcares redutores, estando em conformidade com o comportamento evidenciado no presente trabalho. A partir de 29 h de fermentação percebeu-se que os açúcares redutores começaram a decrescer com o prosseguimento dos processos fermentativos na maioria dos experimentos, provavelmente ao serem utilizados concomitantemente com a pectina como fonte de energia pelo microrganismo.

Tabela 4.4. Dados da atividade de AR para cada ensaio e por tempo de fermentação

Tempo (h)	Ensaios										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
0	11,814	8,253	11,896	8,425	9,201	8,780	10,068	8,189	6,608	11,693	10,731
5	11,406	9,191	12,824	9,616	10,945	11,097	11,087	9,186	8,607	11,797	11,683
21	11,928	8,755	12,560	9,679	10,435	9,956	10,474	7,885	11,073	12,378	11,562
29	12,069	7,890	12,567	9,967	8,774	8,359	12,370	9,505	12,806	11,465	11,339
46	12,541	7,895	13,365	10,203	10,845	1,977	12,543	7,900	10,409	14,482	13,622
54	11,647	2,112	13,391	9,155	15,270	2,884	13,472	4,050	11,512	14,813	14,101
70	12,934	2,239	8,733	7,337	17,559	3,704	14,189	2,629	3,510	13,725	11,418
78	2,532	7,070	15,512	8,428	18,254	2,094	1,980	5,660	3,484	14,335	12,726

Nos tempos finais de fermentação, 70-78 h, foram constatados os conteúdos mais baixos para os açúcares redutores na grande maioria dos meios fermentados, todavia com os ensaios 5, 10 e 11 revelando para a faixa mencionada valores mais elevados do que os determinados no tempo inicial. Apesar de autores como Fawole e Odunfa (2003) relatarem que concentrações elevadas de açúcares no meio supririam a necessidade dos microrganismos para seu crescimento e, nestas condições, a pectina no meio seria pouco utilizada para produção de pectinases, observou-se que os níveis relativamente elevados de açúcares nos experimentos citados não afetaram a atividade poligalacturonásica, estando em coerência com alguns resultados da literatura.

Bravo et al. (2000) estudaram as condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus* variando-se as concentrações de açúcar no caldo de cana, sulfato de amônio e pectina cítrica e constataram que a concentração de açúcar no caldo de cana não afetou significativamente a produção da enzima e, portanto, poderia ser utilizado em qualquer concentração entre 9,17 e 14,83 °Brix. Isto corrobora os dados desta pesquisa, haja vista que mesmo em concentrações mais

elevadas de açúcares redutores foi constata atividades enzimáticas consideráveis (Tabela 4.4).

Especulou-se que, mesmo em níveis elevados de açúcares, o metabolismo do microrganismo utilizado foi direcionado para a quebra da molécula de pectina, de modo que pudesse ser consumida, ocasionando, portanto, elevadas atividades pectinolíticas (FAWOLE e ODUNFA, 2003). Observou-se ainda que as amostras 2, 6 e 8, experimentos estes com as maiores umidades iniciais (60%), foram as que revelaram os menores conteúdos de açúcares redutores a partir das 48 h de fermentação até ao final do processo, o que poderia estar relacionado à maior ação do microrganismo utilizado que foi favorecido pela maior disponibilidade de água.

Foi possível perceber influência do teor de umidade (Tabela 4.5) nos picos de maior atividade PG, onde os experimentos com menor atividade PG foram geralmente aqueles com menores teores de umidade, enquanto que as maiores atividades PG foram registradas nos experimentos com valores de umidade intermediário e mais elevados. Isto era esperado, haja vista que SANTOS et al. (2008b) relataram que a umidade do meio é a variável mais importante para o processo de produção de pectinases, afetando diretamente as necessidades do microrganismo, além do tipo de produto final (ALCÂNTARA et al., 2007).

Ao pesquisarem a produção da poligalacturonase através da fermentação em estado sólido, usando como substrato o pedúnculo de caju seco e como agente da fermentação o microrganismo *A. niger*, Santos et al. (2008a) verificaram que a umidade foi a variável que teve maior influência no processo, corroborando os dados desta pesquisa. Os resultados deste trabalho podem estar relacionados à atividade de água (a_w) dos substratos que ficaram mais próximos aos valores ótimos de crescimento do *A. nig*er.

No estudo de Pinto et al. (2005) foi investigado o crescimento da linhagem *A. niger* CNPAT 001 após 96 h de crescimento em meio de película de amêndoa de caju e casca de maracujá triturada e foi constatado que os maiores níveis de crescimento foram obtidos quando a a_w inicial foi entre 0,96 e 0,97. Foi evidenciado ainda pelos autores que a produção da poligalacturonase foi afetada pelos diferentes níveis de a_w inicial, onde a resposta de síntese teve seu ótimo, quando esse parâmetro ficou entre 0,96 e 0,97. Considerando-se estes resultados, provavelmente os níveis de umidade mais elevados favoreceram o crescimento do *A. niger* no bagaço de laranja deste trabalho e,

consequentemente, houve maior atividade PG. Para o ensaio 5 verificou-se que o teor de umidade foi estável até 29 h de fermentação sendo detectado, nos tempos posteriores, progressivas quedas nesses valores podendo estar relacionado a perda de água por dessecação favorecida pela temperatura relativamente mais elevada (35 °C). Esta redução no conteúdo de umidade pode ter contribuído para a redução da atividade PG, uma vez que a maior produção de enzimas pectinolíticas neste ensaio foi ao final do período estável, ou seja, 29 h (Tabela 4.2).

Podem ser observados na Tabela 4.5 os valores médios dos teores de umidade para cada ensaio durante a fermentação semissólida da farinha do bagaço de laranja por *Aspergillus nig*er CCT 0916. Observou-se que os teores de umidade permaneceram constantes durante o processo na maioria dos experimentos, estando em conformidade com os apontamentos de Souza et al. (2010) que, ao produzirem poligalacturonase por fermentação semissólida de resíduo do maracujá como substrato e o *A. niger* CCT 0916 como agente da fermentação, notaram estabilidade da umidade durante a fermentação, apesar de algumas oscilações.

Já no experimento 10, constatou-se estabilidade do teor de umidade até 29 h de processo, com posterior elevação do nível de água da amostra para valores próximos a ~60% nos tempos subsequentes provavelmente relacionado à saturação do ambiente onde se encontrava o experimento com vapor de água. Todavia percebeu-se que esse fenômeno não influenciou na atividade PG, uma vez que houve maior produção de enzimas em umidades mais elevadas (Tabela 4.2.), como já discutido.

No estudo de Pinto et al. (2005) foi verificado que a adição de níveis constantes de água em cascas de maracujá triturada e em películas de amêndoa de caju promoveram obtenção de teores de umidade muito próximos, entretanto com diferenças quanto as atividades de água. Logo, o estudo da umidade como fator limitante ao crescimento de fungos produtores de pectinases faz-se importante para qualquer resíduo agroindustrial utilizado. Levando-se em consideração essas informações, provavelmente os experimentos com maiores conteúdos de umidade inicial (60%) tiveram valores de atividade de água mais aproximadas à faixa ótima de crescimento do microrganismo inoculado, seguidos dos ensaios com umidades iniciais intermediárias (50%).

Tabela 4.5. Dados dos teores de umidade (%) para cada ensaio e por tempo de fermentação

Tempo (h)	Ensaios										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
0	38	60	41	59	42	56	41	58	50	51	48
5	42	58	41	57	43	49	43	57	57	52	49
21	42	58	41	59	43	51	42	58	50	51	48
29	41	58	41	58	40	48	42	54	50	56	49
46	39	58	40	58	34	60	41	56	50	63	48
54	41	65	41	61	31	53	42	59	50	61	46
70	41	68	46	62	29	60	40	62	51	59	50
78	38	62	39	62	28	59	40	61	50	62	49

De acordo com Alcântara et al. (2007), a água no meio fermentativo semissólido deve possuir um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos inoculados. Assim, entende-se que o desenvolvimento e consequente produção de enzimas pectinolíticas por fungos não está relacionado apenas ao teor de umidade, mas principalmente a atividade de água, que é a medida de água livre presente no meio fermentescível. Em valores extremos de atividade de água, tanto baixos quanto muito elevados, o metabolismo do microrganismo pode ser afetado, ou seja, a atividade PG tende a ser decrescida. Para se ter uma ideia, valores de umidade semelhantes em substratos constituídos por diferentes resíduos agroindustriais podem fornecer atividades de água distintas.

4.3. Verificação das variáveis independentes sobre os picos das atividades enzimáticas observadas

O planejamento experimental possibilita realizar uma análise do processo fermentativo com base nos dados dos picos de produção enzimática para cada ensaio. Constataram-se os maiores valores de PG e o tempo no qual foi atingida a maior produção em cada ensaio. Na Tabela 4.6 são observados os níveis codificados das variáveis independentes Umidade (U), fonte de Nitrogênio (N), Temperatura (T), os valores dos picos da atividade poligalacturonásica (PPG) e o tempo o qual a maior produção foi constatada.

Tabela 4.6. Dados dos picos da atividade poligalacturonásica segundo planejamento experimental fatorial 2^3

Ensaio	U (%)	N (%)	T (°C)	AE (PPG)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	6,11	70
2	+1	-1	-1	9,19	70
3	-1	+1	-1	5,61	70
4	+1	+1	-1	18,78	70
5	-1	-1	+1	10,85	46
6	+1	-1	+1	9,80	54
7	-1	+1	+1	6,56	70
8	+1	+1	+1	9,21	78
9	0	0	0	9,10	54
10	0	0	0	11,03	78
11	0	0	0	10,32	78

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear. A Equação 4 representa o modelo de resposta para atividade poligalacturonase, a qual foi codificada em função das variáveis Umidade (U), concentração de Nitrogênio (N) e Temperatura (T). Os coeficientes em negrito são os estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança, como podem ser observados no Diagrama de Pareto (Figura 4.2).

$$Atividade\left(\frac{U}{g}\right) = \mathbf{9,6872} + \mathbf{2,2312}\,\mathrm{xU} + 0{,}5262\mathrm{xN} - 0{,}4087\mathrm{xT} + \mathbf{1,7237}\mathrm{xUxN} - \mathbf{1,8312}\mathrm{xUxT} - \mathbf{1,7462}\mathrm{xNxT} \quad (4)$$

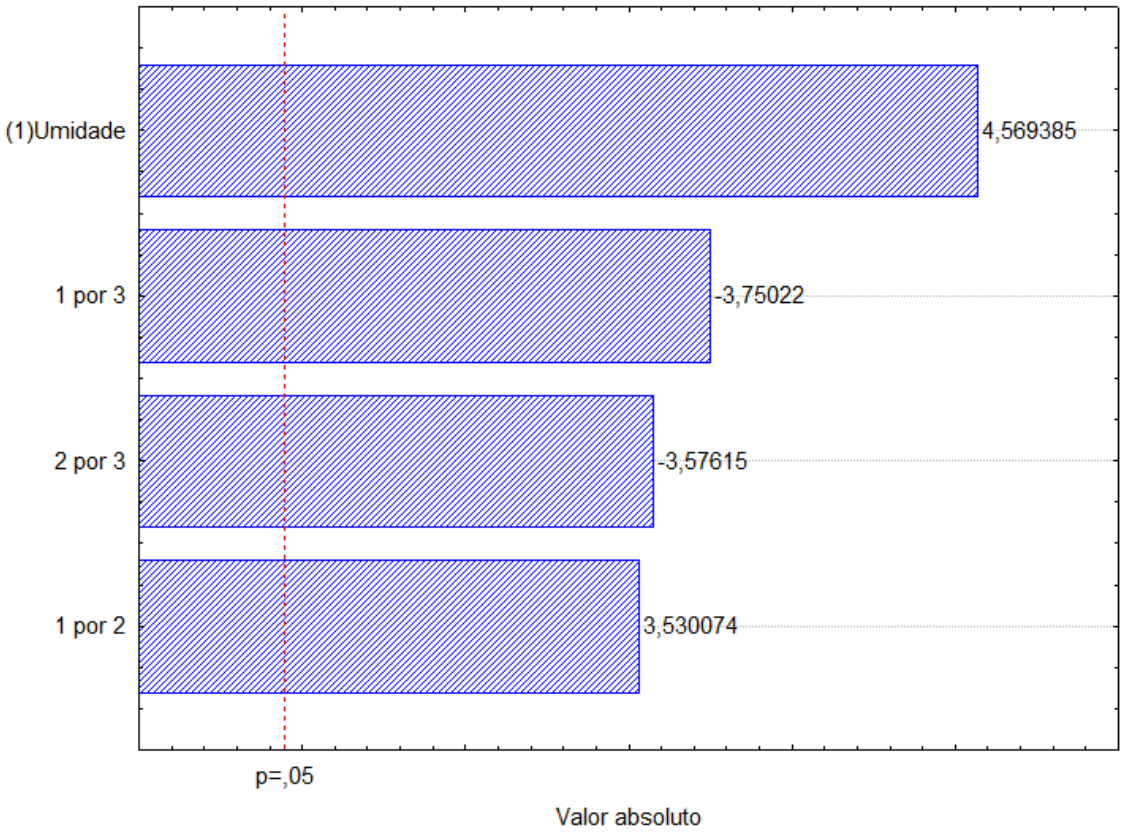

Figura 4.2. Diagrama de Pareto das variáveis Umidade (1), e interações Umidade (1) por Nitrogênio (3), Temperatura (2) por Nitrogênio (3) e Umidade (1) por Temperatura (2) para os picos de atividade enzimática da poligalacturonase

Analisando os resultados para poligalacturonase (Figura 4.2), verifica-se que das três variáveis independentes, somente a umidade foi estatisticamente significativa, no entanto, as interações entre as mesmas apresentaram significância a um nível de 95% de

confiança. A umidade é a variável mais importante para o processo fermentativo, neste estudo, a mesma apresenta valor de sinal positivo, logo, o maior valor de atividade poligalacturonase é atingido para os maiores valores de umidade, as outras variáveis fonte de Nitrogênio e Temperatura não apresentaram significância para este processo, mas as suas interações apresentaram significância.

Tabela 4.7. ANOVA para pico de Atividade Poligalacturonásica

	GL	SQ	QM	Teste F
Regressão	4	114,8212	28,7053	15,05
Resíduo (erro)	6	11,4452	1,9075	
Total	10	126,2664		

$R^2 = 0,909$, $F_{tab\ (4,6)=}$ 4,53

Através dos dados da Tabela 4.7, verifica-se que o modelo é estatisticamente significativo, ao nível de 95% de confiança, pois a razão de $F_{calculado}$ por $F_{tabelado}$ é igual a 3,3 estando acima de 1,0 (RODRIGUES E IEMMA, 2014). O coeficiente de determinação ficou próximo de 1, sendo possível utilizar este modelo para descrever 90,9% deste processo. O coeficiente de determinação ou explicação R^2 quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Varia de 0 a 100% (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Santos et al. (2008), trabalhando com produção de pectinase por fermentação em estado solido com pedúnculo de caju, obteve para o modelo de atividade de PG um coeficiente de determinação de 97,3% e uma razão de $F_{calculado}$ por $F_{tabelado}$ de 1,75.

Bravo (2000) estudou a influência da concentração de açúcar no caldo de cana, concentração de sulfato de amônio e pectina cítrica nos meios fermentativos, utilizando o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* para produção de poligalacturonase e sua ANOVA apresentou um coeficiente de determinação de 85,11 % e um desvio de regressão significativo (P = 0,0001), o R^2 apresenta um valor adequado, indicando uma boa relação dos dados com o modelo de regressão definido pela análise de variância.

Verifica-se na Figura 4.3 que operando o processo de produção da enzima, fixando a umidade no nível máximo (+1), 60%, fonte de N no nível +1 (2%) e

temperatura no nível -1 (25 ^{0}C), observa-se o aumento da atividade poligalacturonase, alcançando valor máximo de 17,22 U/g.

No experimento 4, Tabela 4.6, pode ser observado que a máxima produção da poligalacturonase ocorreu para valores de nitrogênio de 2%, de umidade 60% e temperatura de 25 $^{\circ}$C , sendo então de 18,78 U/g, estando a análise de superfície de resposta do modelo das atividades no pico (Figura 4.3), em consonância com o experimento 4, ou seja, que a máxima produção está quando se opera para os maiores valores de umidade e nitrogênio e menor temperatura, com o valor máximo de 17,22 U/g. A diferença entre o valor experimental e o valor do modelo empírico é de 8,3%, considerado um % de erro baixo, pois está abaixo de 10%.

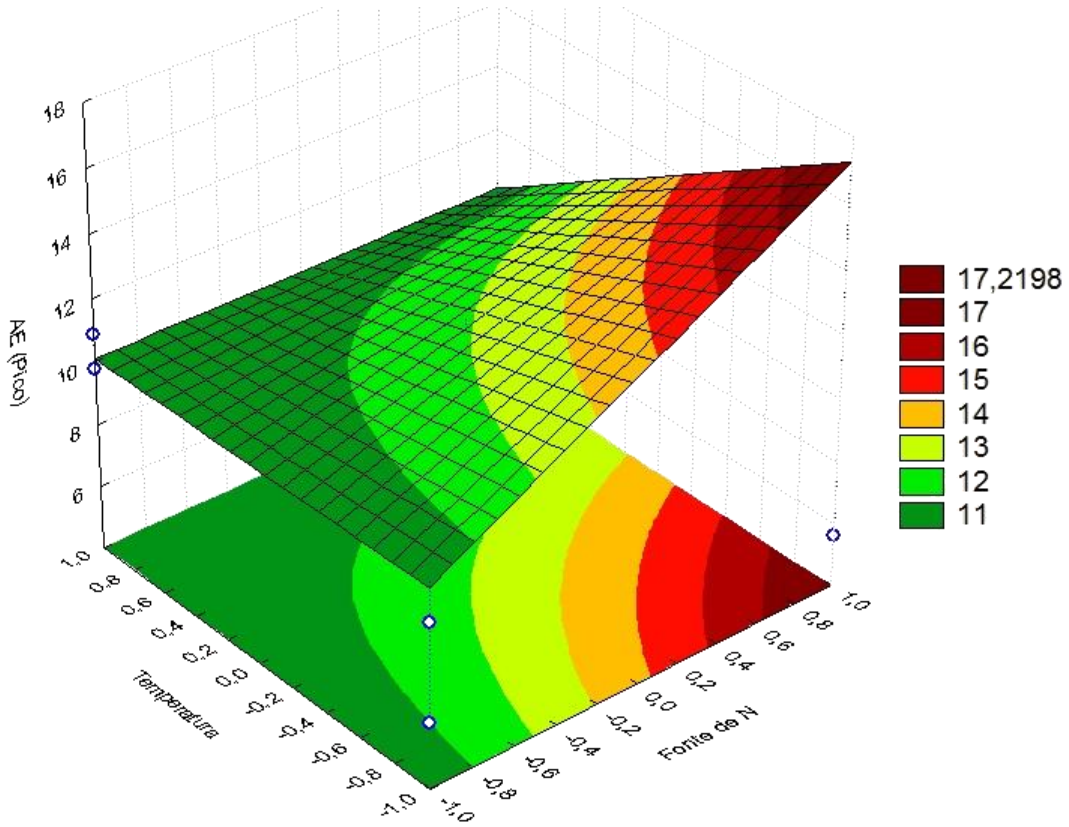

Figura 4.3. Superfície de resposta do pico de atividade de poligalacturonase em função dos valores codificados do nitrogênio e da fonte de Nitrogênio, fixando-se a variável umidade no nível +1 (60%).

Ustok et al. (2007) trabalharam com resíduo de milho fornecido por uma empresa local de sua região, utilizando como microrganismo o *Aspergillus sojae* ATCC

20235 para a fermentação em estado sólido para a produção de poligalacturonase, avaliaram os dados pela ferramenta de superfície de reposta em que a atividade enzimática prevista foi de 30,55 U/g e contagem de esporos de $2,23 \times 10^7$ esporos/mL foram muito próximos dos valores reais obtidos experimentalmente de 29,093 U/g e $2,31 \times 10^7$ esporos/mL , respectivamente.

Observa-se na Tabela 4.6 que nas condições do experimento: 60% de umidade, 2% da fonte de nitrogênio e temperatura de 25°C, no tempo de 70 h de cultivo, tem-se o maior valor de atividade PG de 18,78 U/g.

Santos (2007) estudando a produção de PG usando bagaço de pedúnculo de caju seco obteve o pico de atividade da poligalacturonase de 9,84 U/g, para 22 h de processo, nas condições de umidade de 40%, nitrogênio de 1% a 30 °C. Os valores absolutos de atividade obtidos no presente trabalho são maiores que os obtidos por Santos (2007), o que indica ser o bagaço de laranja um substrato promissor na obtenção da PG.

4.4. Verificação das variáveis independentes sobre as atividades enzimáticas observadas

Utilizando-se o planejamento experimental 2^3 com as variáveis independentes, Umidade, teor de Nitrogênio e Temperatura e com superfície de resposta como ferramenta para determinar as condições ótimas de cultivo e maximização da produção enzimática. A Tabela 4.8 mostra os dados da atividade poligalacturonásica dos 11 ensaios em função do tempo de fermentação (5h, 21h, 29, 46h, 54h, 70h, 78h), os dados em negrito representam as maiores atividades enzimáticas por tempo de fermentação.

Utilizando a ferramenta do planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível investigar a influência das variáveis em um processo e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que otimizem os resultados (SANTOS et al.,2008a).

Observa-se que no tempo inicial de 5 horas de processo fermentativo a produção de PG é baixa em todos os ensaios, até as 29 horas de fermentação não são constatados nenhum dado com produção superior a 7,59 U/g, sendo que a partir das 46 horas de fermentação observou-se uma produção superior a 10 U/g de PG, houve um aumento de 18% na produção de PG no tempo de 54 horas encontrado no ensaio 4 com 12,80 U/g,

atingindo-se a produção máxima no ensaio 4 com 70 horas de fermentação de 18,78 U/g.

Tabela 4.8. Dados da atividade poligalacturonásica por tempo de fermentação

Tempo	Ensaios Atividade poligalacturonásica (PG)										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
5	0,00	0,00	**1,08**	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96	0,56
21	1,26	2,10	1,38	0,76	5,06	5,15	2,11	6,43	5,50	**7,14**	4,80
29	1,99	**7,59**	3,12	1,40	3,95	3,81	2,92	6,39	5,09	6,74	4,77
46	3,00	7,94	5,12	0,56	**10,85**	8,27	5,54	7,93	6,54	6,54	6,95
54	3,59	8,74	5,44	**12,80**	1,32	9,8	5,43	7,85	9,10	7,02	8,06
70	6,11	9,19	5,61	**18,78**	5,91	9,23	6,56	8,81	7,63	4,68	8,82
78	5,18	8,26	2,94	10,96	6,26	9,79	4,27	9,21	6,50	**11,03**	10,32

Com os dados da Tabela 4.8 foi realizada a análise de variância de cada tempo de fermentação com a finalidade de identificar qual modelo empírico foi significativo e/ou preditivo, sendo calculado para cada tempo o coeficiente de determinação (R^2) e a razão de $F_{calculado}$ por $F_{tabelado}$ para a identificação dos modelos estatisticamente significativos e qual modelo melhor se ajustou aos dados experimentais.

A Tabela 4.9 apresenta os modelos matemáticos empíricos obtidos pela regressão linear dos dados experimentais do planejamento fatorial para cada tempo de fermentação, com 88% de confiança. Os dados em negrito sinalizam que foram estatisticamente significativos com este nível de confiança. Observa-se que os modelos para 46, 54 e 78 horas de fermentação foram significativos no Teste F, sendo assim seu valor superior a 1, no entanto o modelo no tempo de 54 horas obteve os maiores valores de parâmetros estatísticos com o coeficiente de determinação (R^2) de 0,821 e teste F 3,49, sendo assim o que possui maior capacidade de explicar o processo.

Conforme os modelos significativos constatam-se que a umidade inicial possui um efeito positivo sobre o processo fermentativo, independentemente do tempo com exceção do tempo de 5 horas, indicando que a atividade poligalacturonásica tende a aumentar de acordo com o aumento da umidade inicial do meio.

O tempo de 70 horas não foi estatisticamente significativo para este percentual de confiança, no entanto as variáveis independentes tiveram a mesma influência na atividade poligalacturonásica que o tempo de 54 horas, sendo positivo a umidade inicial, positivo a concentração de nitrogênio e negativo o nível de temperatura.

Tabela 4.9. Modelos empíricos para atividades PG em cada tempo de fermentação

Modelos empíricos	R^2	Teste F
PG (5)= **0,30** - 0,23U + 0,04N - 0,04T - 0,04UN + 0,04UT - 0,23NT	0,229	0,23
PG (21)= **3,79** + 0,58U - 0,35N + 1,66T + 0,35UN + 0,52UT - 0,05NT	0,488	0,72
PG (29)= **4,34** + 0,90U - 0,44N + 0,37T - 0,46UN - 0,07UT + 0,82NT	0,232	0,23
PG (46)= **6,29** + 0,02U **– 1,36N + 1,99T – 0,56UN** – 0,07UT – 0,04NT	0,613	**1,20**
PG (54)= **7,20 + 2,93U + 1,01N** – 0,77T – 0,48UN – 0,20UT – 0,46NT	0,821	**3,49**
PG (70)= **8,30 + 2,72U** + 1,17N – 1,14T + 1,12UN – 1,36UT – 1,11NT	0,55	0,94
PG (78)= **7,70 + 2,44U** - 0,26N + 0,27T + 0,79 UN – 0,33UT – 0,38NT	0,61	**1,21**
$F_{tab(3,7)}$ = 3,07		

Santos et al. (2008) trabalhando com a farinha do pedúnculo de caju constataram que os maiores valores de atividade enzimática foram para 30 horas de fermentação, com umidade de 40 %, nitrogênio de 1% e sem adição de fonte de fósforo obtendo uma atividade poligalacturonásica de 15,55 U/g.

Nighojkar et al. (2006) obtiveram produção máxima da enzima trabalhando com 3 % de alginato para imobilizar a enzima e 1,5 % de indutor de casca de laranja com 72 horas de fermentação, utilizando como microrganismo o *Aspergillus niger*.

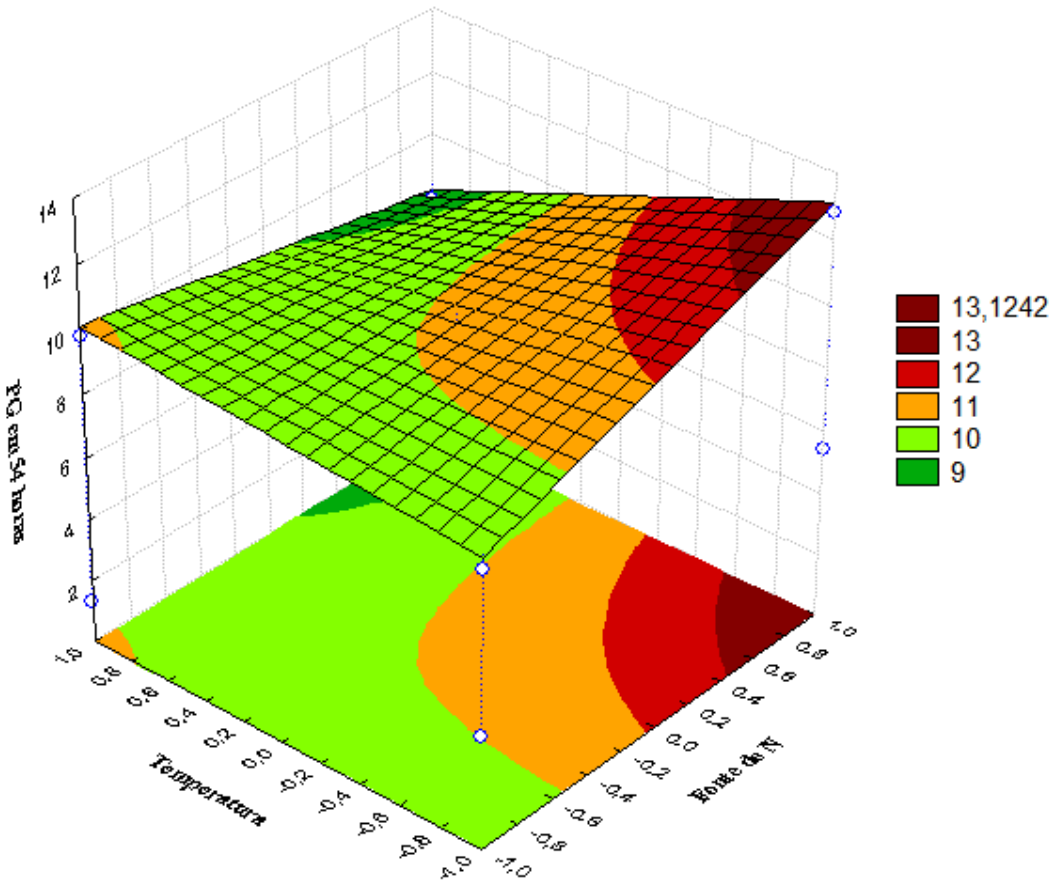

Figura 4.4. Superfície de resposta para atividade poligalacturonase no tempo de 54 horas de fermentação, fixando a variável umidade no nível +1 (60%).

Verificando-se pontualmente os experimentos da Tabela 4.9, no tempo de 70 horas, ocorreu a maior atividade poligalacturonásica (18,78 U/g), sob as condições de 60% (nível +1) de umidade inicial, 2% (nível +1) de concentração de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) e 25°C (nível -1) de temperatura de fermentação. Estes dados dos níveis das variáveis independentes do processo em estudo corroboram com o estudo da superfície de resposta para o tempo de 54 horas (modelo matemático estatisticamente significativo, ao nível de confiança de 88%), Figura 4.4. Ou seja, mesmo o modelo matemático de processo fermentativo no tempo de 70 horas não apresenta significância estatística, analisando pontualmente o experimento 4, Tabela 4.9, pode-se observar tendência de atividade da enzima máxima de 18,78 U/g, operando a fermentação com os níveis que maximizam o processo em estudo.

Li et al. (2015) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção de pectinases, em processo de fermentação submersa, tendo como substrato cascas de laranja em pó. A caracterização do substrato forneceu as concentrações: cinzas 3,94%, proteína 6,25% e pectina 22,10%. Além disso, o planejamento fatorial Plackett-Burman executado definiu que a temperatura e a concentração de NH_4Cl possuíam significativa influência sobre a atividade da enzima exo-pectinase. A temperatura ótima de produção enzimática (36,88 U/mL) foi igual a 36,5°C, com 1,12 g/L de concentração de NH_4Cl.

5. CONCLUSÕES

- A farinha do bagaço da laranja pêra apresentou-se como uma excelente fonte para fermentação utilizando-se como microrganismo o *Aspergillus niger* na produção de pectinase;

- A caracterização físico-química da farinha do bagaço da laranja pêra apresentou um teor alto de açúcares redutores (AR);

- A umidade apresentou influência positiva na produção de poligalacturonase e foi estatisticamente significativa, enquanto as outras variáveis temperatura e fonte de nitrogênio não foram estatisticamente significativos, mas as interações apresentaram significância;

- O tempo de 54 horas foi o tempo de fermentação que foi estatisticamente significativo a 88% de confiança, e coeficiente de determinação de 82,1%, sendo o que mais se aproximou de 1.

- A maior atividade poligalacturonase deu-se no ensaio 4 nas condições de 60% de umidade, 2,0% de fonte de nitrogênio e 25 °C de temperatura, atingindo 18,78 U/g.

.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Solo - Análise Granulométrica NBR-7181**, 1984.

ALBUQUERQUE, P.M.; KOCK, F.; TROSSINI, T.G.; ESPOSITO, E.; NINOW, J. Enriquecimento do bagaço de maça com proteína fúngica através da fermentação em estado solido. In: **XIV SIMPOSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES**, 2003, Florianópolis. Anais... XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

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

ALCÂNTARA, S. R.; SILVA, F. L. H. SILVA. Avaliação da temperatura em um processo de fermentação semi-sólida para produção de poligalacturonases. XVIII Congresso brasileiro de engenharia química. 2010.

ALCÂNTARA, S. R; SOUSA, C. A. B; ALMEIDA, F. de A. C; GOMES, J. P. Caracterização físico-química das farinhas do pedúnculo do caju e da casca do maracujá. **Revista Brasileira de ProdutosAgroindustriais**, v.15, n.4, p.349-355, 2013.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia**: **Tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, v.2, 1990.

BON, E. P. S. Enzimas industriais: Política e gestão. In: Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática, 5, 2002, Brasília. **Anais...**Brasília-DF, 2002.

BORGES FILHO, **Laranja - Importância econômica**, 2011. Disponível em: <http://laranjaeeconomia.blogspot.com.br/2011/05/as-variedades-da-laranja.html>. Acesso em 20 de fev. 2016.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.42, n.1, p. 98-101, 2007.

BRASIL. Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1015 p.

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

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

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1997.

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

CASTRO, R. J. S.; TORRES, M. B. O.; FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando torta de girassol como substrato. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17, 2009. **Anais...** Natal: SINAFERME, 2009.

CHAVES, M. da C. V.; GOUVEIA, J. P. G. de; ALMEIDA, F. de A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. da. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n.2, p.1-10, 2004.

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. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.19, n.1, p.33-42, 2001.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 135-141, 2009.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cereviseae e Rhizopus oligosporus*.**. Tese-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.

COSTA, M.C.O. **Estudo da estabilidade do suco de caju (Anacardium occidentale L.) preservado pelos processos hot fill e asséptico.** 1999. p.81, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

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

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**., v.30, suppl.1, p.15-19, 2010.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal** , v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

DANIEL, M. R.; TRINDADE, V.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Influência do pH na produção de pectinases usando casca de limão como meio semi-sólido. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 5, 1996, Maringá. **Anais...**Maringá: UEM, 1996. Disponível em: <http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20sheb/Oral/Oral_11.pdf.> . Acesso em: 12 jul. 2015.

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

DETONI, A. M.; HERZOG, N. F. M.; OHLAND, T.; KOTZ, T.; CLEMENTE, E. Influência do sol nas características físicas e químicas da tangerina Ponkan cultivada no Oeste do Paraná. Revista Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, n. 2, p. 624-8, 2009.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. 1. ed. Londres: Elsevier, p.474, 1992.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**, Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p.1-18,2005.

DUENHAS, L. H.; BÔAS, R. L. V.; SOUZA, C. M. P. de; RAGOZO, C. R. A.; BULL, L. T. Fertirrigação com diferentes doses de NPK e seus efeitos sobre a produção e qualidade de frutos de laranja (*Citrus sinensis* O.) Valência. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 214-8, 2002.

ESPINOZA-NUNEZ, E.; MOURAO FILHO, F. de A. A.; STUCHI, E. S.; ORTEGA, E. M. M. Desenvolvimento e produtividade da tangerina “Fairchild” sobre quatro portas-enxerto. Ciência Rural, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1553-7, 2008.

FARINAS, C. S.; LEMOS, V. ;RODRÍGUEZ-ZúNIGA, U. F; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **Boletim Técnico Embrapa**, 2008.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.52, n.4, p.223-227, 2003.

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

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

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

GUTIERREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E.; CORDOVA-LOPES, J. GARCIA-RIVERO, M. Kinects of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid fermentation. **Process Biochemistry,** v.33, n.2, p.103-103, 1998.

HAN, Y.W., GALLAGHER, D.J., WILFRED, A. G.. Phytase production by Aspergillus ficuum on semi solid substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, v.2, p.195- 200, 1987.

HESSELTINE, C.W. Solid state fermentation**. Biotechnology and Bioengineering,** vol. 14, p. 517-532, 1972.

HOLANDA, J.S.; OLIVEIRA, A.J.; FERREIRA, A.C. Enriquecimento proteico de pedúnculos de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v.33, n.5, p.79-81, 1997.

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

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA,R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v40, n.9, p.2931-2944, 2005.

LEITE, L.A. de S. A agroindústria do caju no Brasil: políticas públicas e transformações econômicas. Fortaleza: **EMBRAPA-CNPAT**, p.195, 1994.

LI, P.; XIA, J.; SHAN, Y.; NIE, Z.; SU, D.; GAO, Q.; ZHANG, C.; MA, Y. Optimizing production of pectinase from orange peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 using response surface methodology. **Waste biomass Valor**, v. 6, p. 13-22, 2015.

LONSANE, B. K.; GHIDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enz. And Microbial Technol**., v.7, p.258-265, 1985.

LOPES, J.M.S; DÉO, T.F.G; ANDRADE, B.J.M; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S. JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância econômica do citros no Brasil, **Revista científica eletrônica de agronomia,** p.1-3, 2011.

MACIEL, M.; OTTONI, C.; SANTOS, C.; LIMA, N.; MOREIRA, K.; SOUZA-MOTTA, C. Production of polygalacturonases by *Aspergillus* Section *Nigri* strains in a fixed bed reactor. **Molecules**, v.18, n.2, p.1660-1671, 2013.

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

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

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Citrus. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. Acessado em: 21 de fev. 2016.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

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.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, 5, Brasília, DF, 2002.

MUNHOZ, C.L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; SOARES JÚNIOR, M. S. Extração de pectina de goiaba desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 2008.

MURTHY, R.M.V.; KARANTH, N.G; RAO, R.K.S. Biochemical engineering aspects of solidstate fermentation. **Advances in Applied Microbiology.** v.38, p.99-149, 1993.

MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; SÍLVIA, M.; TEIXEIRA, J. A. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. In Yeow, S.K., Xinxin, G., **Industrial Waste**, Rijeka, Croatia, p. 121-140, 2012.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of Aspergillus oryzae. **Journal Fermentation Technology**, v.60, n.4, p.311-319, 1982.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F. (Org.). **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 225 p., 2005.

NIGHOJKAR, S.; PHANSE,Y.; SINHA,D.; NIGHOJKAR,A.; KUMAR, A.; Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochemistry**, v.41, p.1136–1140, 2006.

NOSB - National Organic Standards Board. Enzymes, Plant and Fungal, 1999. Disponível em: http://www.ams.usda.gov/AMSv1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5057593. Acesso em: 08 jul, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SOUZA FILHO, P. F.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S.; ASSIS, C. F. Produção de enzimas pelo fungo *penicillium chrysogenum* e um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*) em fss utilizando resíduo de coco como substrato. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2014.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L.C.; MOURA, C.S.F.T. Frutas cítricas. Revista **Faculdade Montes Belos**, v.5, p.4, 2012.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal,** v.13, p.81-84, 2003.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology management e innovation**, v.2, março, 2007.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. 1ª ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 5 p. (Comunicado Técnico, 102), 2005.

PROTZEK, E. C.; FREITAS, R. J. S.; WASCZYNSKJ, N. Aproveitamento do bagaço de maça na elaboração de biscoitos em fibra alimentar **Boletim CEPPA**, v.16, n.2, p.263-275, 1998.

RAMOS, L. DE S.N.; LOPES, J.B; FIGUEIREDO; A.V.; FREITAS, A.C.DE; FARIAS L.A.; SANTOS, L.DA S.; SILVA, H.O. Polpa de caju em rações para frangos de corte na fase final: desempenho e característica da carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v.35, n.3, p.804-810, 2006.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New De lhi: Tata Mc Graw Hill Publishing Company, p.634, 1979.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª Ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, p. 326, 2005.

RODRÍGUEZ-JASSO, R. M. **Extraction and characterization of mexican lemon pectin by an alternative clean methodology (in Spanish)**. Undergraduate Thesis, Food Research Department, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, Mexico, 2003.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal.** 65 ,p.90-95, 2012.

SALIBE, A.A. , TEÓFILO SOBRINHO, J. Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra', **LARANJA**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.231-245, 2002.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese (Doutorado em engenharia Química) - Universidade federal do rios Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1973-1978, 2008a.

SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.10, n.2, p.101-109, 2008b.

SCHALCH, F. J.; SCHALCH, E.; ZANETTI, M. A.; BRISOLA, M. L. Substituição do milho grão moído pela polpa cítrica na desmama precoce de bezerros leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.280-285, 2001.

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

SILVA, J. D. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. São Paulo: Editora UFV, p.166, 1998.

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.

TELES, M.M. 2006. 130 f. **Características fermentativas e valor nutritivo de silagens de capim-elefante contendo subprodutos do urucum, caju e manga.** Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.509-515, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

USTOK; F.I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology** , v127, p. 322–334, 2007.

VIEIRA, P. A. F.; QUEIROZ, J. H. de; VIEIRA, B. C.; MENDES, F. Q.; BARBOSA, A. de A.; MULLER, E. S.; SANT'ANA, R. de Ac. O.; MORAES, G. H. K. de. Caracterização química do resíduo do processamento agroindustrial da manga (*Mangifera indica* L.) Var. Ubá. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.4, p.617-623, 2009.

WILKINS, M. R.; SURYAWATI, L.; MANESS, N. O.; CHRZ, D. Ethanol production by Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces marxianus in the presence of orange-peel oil. **World J Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.8, p.1161-1168. 2007.