

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE STOCK

**Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases
produzidas por fermentação no estado sólido**

CURITIBA

2013

DANIELE STOCK

**Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases
produzidas por fermentação no estado sólido**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, no curso de Pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Nadia Krieger
Área de concentração: Química Orgânica

CURITIBA

2013

Stock, Daniele

Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido / Daniele Stock. – Curitiba, 2013.

106 f. : il.; tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Nadia Krieger

1. Pectina - Fermentação. I. Krieger, Nadia. II. Título.

CDD 660.28449

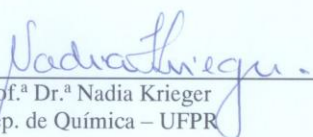
TERMO DE APROVAÇÃO

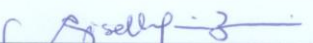
CONVERSÃO DE PECTINA CÍTRICA A ÁCIDO D-GALACTURÔNICO USANDO
PECTINASES PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO


por

DANIELE STOCK

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 
Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger
Dep. de Química – UFPR


Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Dep. de Eng. Química - UEM


Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de março de 2013

Dedico este trabalho aos meus pais,
Haralt e Irene Stock, meu porto-seguro.

AGRADECIMENTOS

À Deus

Aos meus pais, Haralt e Irene, pelo carinho, amor e palavras de conforto. Obrigada pelo apoio incondicional ao longo desta, e muitas outras caminhadas. Vocês são minha fortaleza. E também à minha irmã Isabele, pelos conselhos, carinho e amizade.

Ao meu namorado, Rainer Mathias, por estar sempre ao meu lado, me dando forças para continuar, sempre me tranquilizando com o seu carinho.

À professora Nadia Krieger, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, e pela confiança para realizar este trabalho.

Ao professor David, por toda a ajuda, e pelos conselhos.

À todos os colegas e amigos do LTEB e LTEF, Alessandra, Fernanda, Maura, Wellington, Luana, Vanderléia, Aline, Diniara, Allen, Jonas, Robson, Mirian, Maritza.

Principalmente à Alessandra por toda a ajuda durante, e principalmente no início do mestrado, e a Vanda que me acolheu e aconselhou quando entrei no programa.

À “galera das pectinases e modelagem” por todos os jantares, almoços e inúmeros cafezinhos na cantina, para descontração.

Aos alunos de iniciação científica, Giovanna, Diogo, Leonardo, Eduardo e Francine, pela dedicação e disponibilidade de ajudar na realização deste trabalho.

Ao professor Alan Gonçalves, pela ajuda e atenção na realização das análises de composição monossacarídica.

Aos membros da Banca Examinadora de Qualificação e Dissertação, Rilton Alves de Freitas, Leandro Piovan e Gisella Zanin pelas valiosas contribuições para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Às minhas amigas, por escutarem os meus desabafos, muitas vezes sem saber do que se tratava. A convivência com vocês é essencial!

À UFPR e ao programa do Pós-graduação em Química, pela oportunidade de realizar o meu mestrado em uma instituição de respeito.

Ao secretário Marcelino.

Ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que fizeram parte ou que de alguma forma me ajudaram na realização deste mestrado.

Muito obrigada!

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

- Marie Skłodowska Curie

RESUMO

A biomassa de resíduos agroindustriais ricos em pectina, como a polpa cítrica, é bastante abundante em alguns países e pode ser explorada para a produção do ácido D-galacturônico por hidrólise química ou enzimática. Este açúcar ácido e seus derivados, ácidos meso-galactárico e L-galactônico, têm aplicações na indústria alimentícia, como agentes acidificantes, e na indústria química como surfactantes e agentes quelantes. Os processos enzimáticos de hidrólise da pectina possuem vantagens em relação aos processos químicos, principalmente a não-degradação dos produtos de hidrólise, a possibilidade de utilizar temperaturas brandas, além de não gerarem efluentes tóxicos. Entretanto, a limitação dos processos enzimáticos está no custo das enzimas, que pode inviabilizar a sua implantação industrial. O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de hidrólise da pectina para produção do ácido D-galacturônico utilizando sólidos fermentados com atividade pectinolítica, produzidos a partir de resíduos agroindustriais. Inicialmente, a produção de pectinases por diversos fungos foi comparada. O sistema selecionado envolve o crescimento de *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, cultivada em meio composto de bagaço de cana (30%) e bagaço de laranja lavado (70%), a 30 °C e 70% de umidade inicial. No decorrer do trabalho, foi otimizado o método de dosagem de pectinases por adição direta do sólido fermentado liofilizado ao meio reacional contendo pectina. A atividade realizada diretamente no sólido foi de cerca de 260 U (uma unidade de atividade corresponde à produção de 1 μmol de ácido D-galacturônico por min) por grama de sólido fermentado liofilizado. Em estudos prévios de hidrólise da pectina cítrica utilizando sólidos fermentados liofilizados, conversões de até 92% foram obtidas após 36 h, utilizando soluções com 2% (m V⁻¹) de pectina. A hidrólise catalisada por sólidos fermentados liofilizados foi otimizada por delineamento fatorial 2³ avaliando-se os efeitos das variáveis “massa de sólido fermentado”, “concentração de pectina” e “temperatura” na conversão (%) da pectina e no teor de ácido D-galacturônico produzido, determinado por CLAE. O modelo matemático foi significativo para a variável “conversão da pectina” (R² = 0,94), e a variável mais importante foi a concentração da pectina no meio (p = 0,0014), que influenciou negativamente a resposta. As variáveis “massa de sólido fermentado” e “temperatura” apresentaram efeitos positivos significativos ao nível de 5% (p = 0,0343 e p = 0,0430, respectivamente). O aumento da concentração de pectina no meio para 15% e 20% confirmou os resultados previstos pelo modelo, tendo sido observada uma diminuição do teor de ácido D-galacturônico produzido e da conversão, quando se utilizou 20% de pectina no meio. A determinação da composição monossacarídica do hidrolisado da pectina mostrou a presença de outros açúcares de interesse industrial, como arabinose, manose e glucose.

Palavras-chave: ácido D-galacturônico, fermentação no estado sólido, pectinases, hidrólise de pectina

ABSTRACT

Pectin-rich agricultural residues, such as citrus pulp, are abundant in various countries and have the potential to be used for the production of D-galacturonic acid by chemical or enzymatic hydrolysis. This acid sugar and key derivatives of it, *meso*-galactaric acid and L-galactonic acid, have applications as acidifying agents in the food industry and as surfactants and chelating agents in the chemical industry. Enzymatic hydrolysis has advantages over chemical hydrolysis for the production of D-galacturonic acid from pectin, since it uses mild temperatures, does not degrade the liberated sugars and does not generate toxic effluents. However, a key limitation of enzymatic hydrolysis is the high costs of the enzymes, which can make large-scale processes economically unviable. The main objective of the current work was to develop a process for the hydrolysis of pectin to D-galacturonic acid using a low cost enzyme preparation, namely fermented solids containing pectinolytic activity. These solids were produced by solid-state fermentation of agricultural residues by pectinolytic fungi. Initially, pectinase production by various fungi was compared. The system selected involved the growth of *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 on a solid medium containing (m/m on a dry basis) 30% sugarcane bagasse and 70% washed orange bagasse, with an initial moisture content of 70% (wet basis) and an incubation temperature of 30 °C. During these studies a pectinase activity assay was developed that involved direct addition of lyophilized fermented solid to a reaction medium containing pectin. Using this assay, the best activity obtained during the fermentation was 260 U (with 1 U of activity corresponding to the production of 1 μ mol of D-galacturonic acid equivalents per minute) per gram of lyophilized fermented solid. In preliminary studies of the hydrolysis of citrus pectin with these lyophilized fermented solids, a percentage conversion of pectin into D-galacturonic of 92% was obtained in 72 h from a 2% (m/V) pectin solution. This hydrolysis process was optimized using a 2³ factorial design, with the studied variables being the mass of added fermented solids, the pectin concentration and the reaction temperature and the response variables being the percentage conversion of pectin and the concentration of D-galacturonic acid obtained. The fitted statistical model for the percentage conversion of pectin was significant ($R^2 = 0.94$), with the most important variable being the pectin concentration ($p = 0.0014$), which had a negative effect. The mass of added fermented solids and the reaction temperature had positive effects ($p = 0.0343$ and $p = 0.0430$, respectively). An increase in the pectin concentration confirmed the predictions of the model, with an increase from 15% to 20% leading to a decrease in the amount of D-galacturonic acid produced and in the percentage conversion. The hydrolysate that was produced using 20% of pectin contained, in addition to D-galacturonic acid, other sugars of commercial interest, such as arabinose, mannose and glucose.

Keywords: D-galacturonic acid, solid-state fermentation, pectinases, pectin hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MOLÉCULA DE PECTINA PARCIALMENTE ESTERIFICADA	20
FIGURA 2 – ESQUEMA ESTRUTURAL DA CADEIA DE PECTINA	22
FIGURA 3 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UMA BIORREFINARIA COMPARADA A UMA REFINARIA DE PETRÓLEO	25
FIGURA 4 – MECANISMO REACIONAL DA HIDRÓLISE DA PECTINA EM MEIO ÁCIDO	28
FIGURA 5 – FORMAÇÃO DE LACTONAS EM MEIO ÁCIDO A PARTIR DA PECTINA.....	28
FIGURA 6 – MECANISMO REACIONAL DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA.....	29
FIGURA 7 – DIVISÃO DE FUNÇÕES DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	30
FONTE: Adaptado de JAYANI, SAXENA E GUPTA (2005).....	30
FIGURA 8 – ATUAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE PECTINASES NA ESTRUTURA DA PECTINA.....	30
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO	34
FIGURA 10 - BIOCONVERSÃO DO D-GALACTURONATO A L-GALACTONATO E A MESO-GALACTARATO.	35
FIGURA 11 – FLUXOGRAMAS DO PROCEDIMENTO PARA DOSAGEM DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA NO EXTRATO BRUTO (A) E POR ADIÇÃO DIRETA DO SÓLIDO FERMENTADO (B).....	55
FIGURA 12 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO DNS (ÁCIDO 3,5 – DINITROSALICÍLICO).....	56
FIGURA 13 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR DIFERENTES CEPAS E EM DIFERENTES MEIOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.	59
FIGURA 14 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>Aspergillus niger</i> CH4 (♦) E <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 (■) EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	61
FIGURA 15 – COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES OBTIDAS COM DIFERENTES PREPARAÇÕES DE PECTINASES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO POR CEPAS DO GÊNERO <i>Aspergillus</i>	63
FIGURA 16 - EFEITO DO pH DA SOLUÇÃO DO MEIO REACIONAL NA ATIVIDADE DE PECTINASES DO SÓLIDO FERMENTADO.....	64

FIGURA 17 – ASPECTO DO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	65
FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DA TRITURAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO COM <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 EM SUA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA.	66
FIGURA 19 – ATIVIDADE RESIDUAL DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 FRENTE A DIVERSAS TEMPERATURAS E TEMPOS DE INCUBAÇÃO.	70
FIGURA 20 – ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	72
FIGURA 21 - ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 FRENTE AO pH DO MEIO.	73
FIGURA 22 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO AO MEIO REACIONAL NA ATIVIDADE DE PECTINASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	74
FIGURA 23 – CINÉTICA DE CONVERSÃO DE PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	75
FIGURA 24 - INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS VALORES PREVISTOS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 PARA VARIÁVEL-RESPOSTA: TEOR DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA PECTINA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	80
FIGURA 25 – VALORES PREVISTOS E OBSERVADOS (A) E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS (B) FORNECIDOS PELO MODELO, PARA A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO DE PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO.	83
FIGURA 26 – RELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS AVALIADOS NA RESPOSTA DE CONVERSÃO DA PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO.	84
FIGURA 27 – CONVERSÃO DE PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	85
FIGURA 28 - CINÉTICA DE HIDRÓLISE DA PECTINA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO produzido por <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	86
FIGURA 29 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO HIDROLISADO DA PECTINA OBTIDO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.	87
FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA a ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM). (A) PADRÕES DE AÇÚCARES, (B) HIDROLISADO DA PECTINA OBTIDO UTILIZANDO COMO	

CATALISADOR O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.....	89
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MASSAS MOLARES DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS..	21
TABELA 2 - QUATRO PRINCIPAIS CLASSIFICAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	23
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DA POLPA DE LARANJA.....	24
TABELA 4 – PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (Continua)	40
TABELA 4 – PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (Continuação)	41
TABELA 5 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PECTINA, DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE HIDRÓLISE NA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01. .	67
TABELA 6 - EFEITO DA MASSA DE SÓLIDO E DO pH NO MEIO SOBRE A ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO COM <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01	68
TABELA 7 - INFLUÊNCIA DO MÉTODO E TEMPO DE SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 EM SUA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA	71
TABELA 8 – DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ APLICADO NO ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01	77
TABELA 9 - VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE AS VARIÁVEIS-RESPOSTA DA HIDRÓLISE CATALISADA POR PECTINASES DE <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.....	78
TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EQUAÇÃO PREVISTA PARA O TEOR DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO LIBERADO NA HIDRÓLISE DA PECTINA CÍTRICA, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 COMO BIOCATALISADOR	79
TABELA 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EQUAÇÃO PREVISTA PARA A CONVERSÃO DA PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01 COMO BIOCATALISADOR.....	82
TABELA 12 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO HIDROLISADO DE PECTINA ^a OBTIDO UTILIZANDO COMO CATALISADOR O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01	88

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIações

BDA – Batata dextrose ágar

CCD – Cromatografia de camada delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico

FDCA – Ácido 2,5-furandicarboxílico (*Furandicarboxylic Acid*)

FES – Fermentação no estado sólido

FS – Fermentação submersa

GalA – Ácido D-galacturônico

HG – Homogalacturonana

PBT - Tereftalato de polibutileno

PET - Tereftalato de polietileno

RG - Ramnogalacturonana

TFA – Ácido trifluoroacético

Tr – Tempo de retenção

U – Unidade de atividade enzimática

VTT - Technical Research Centre of Finland (Centro de Pesquisa Técnica da Finlândia)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	20
2.1.1 Pectina como Matéria-Prima em Biorrefinarias	24
2.2 HIDRÓLISE DA PECTINA	26
2.2.1 Processos químicos.....	26
2.2.2 Processos Enzimáticos.....	28
2.2.3 O Ácido D-galacturônico e suas Aplicações	34
2.3 PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	36
2.3.1 Substratos	37
2.3.2 Micro-organismos produtores de pectinases	38
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 REAGENTES, MATERIAIS E MEIOS DE CULTIVO.....	43
4.2 PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	44
4.2.1 Micro-organismos	44
4.2.2 Manutenção dos Micro-organismos.....	44
4.2.3 Preparo da Suspensão de Esporos.....	44
4.2.4 Cultivos em Estado Sólido.....	45
4.2.5 Solução Salina de Umidificação	46
4.2.6 Obtenção dos Preparados Enzimáticos.....	46
4.3 ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE DOSAGEM DE ATIVIDADE DE PECTINASES POR ADIÇÃO DIRETA DO SÓLIDO FERMENTADO AO MEIO REACIONAL	47
4.3.1 Otimização do Método de Dosagem Direta no Sólido Fermentado Liofilizado.....	47
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO	48
4.4.1 Efeito do Tipo de Secagem	48

4.4.2	Efeito da Trituração do Sólido Fermentado na Atividade Pectinolítica.....	48
4.4.3	Estabilidade ao pH no Meio.....	49
4.4.4	Estabilidade à Temperatura.....	49
4.4.5	Inibição pelo Produto.....	50
4.4.6	Estabilidade ao Armazenamento.....	50
4.5	HIDRÓLISE DA PECTINA CÍTRICA PARA PRODUÇÃO DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM ATIVIDADE PECTINOLÍTICA.....	50
4.5.1	Estudos Preliminares.....	50
4.5.2	Otimização da Hidrólise da Pectina utilizando Delineamento Fatorial 2^3	51
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO HIDROLISADO.....	52
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	53
4.7.1	Determinação de Atividade de Pectinases.....	53
4.7.2	Determinação de Açúcares Redutores pelo Método de DNS.....	56
4.7.3	Quantificação de Ácido D-galacturônico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	56
4.7.4	Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	57
4.7.5	Derivatização das Amostras para Análise em Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.....	57
4.7.6	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.....	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1	PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA DE DOSAGEM DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO.....	59
5.1.1	Cinética de Produção de Pectinases.....	60
5.1.2	Desenvolvimento de Metodologia de Dosagem de Atividade Diretamente no Sólido Fermentado.....	62
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01.....	69
5.2.1	Estabilidade do Sólido Fermentado à Temperatura.....	69
5.2.2	Efeito do Tipo de Secagem.....	70
5.2.3	Estabilidade ao Armazenamento.....	71

5.2.4	Estabilidade ao pH	72
5.2.5	Estudo da Inibição das Pectinases pelo Ácido D-galacturônico	74
5.3	HIDRÓLISE DA PECTINA CÍTRICA PARA PRODUÇÃO DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM ATIVIDADE PECTINOLÍTICA.....	75
5.3.1	Estudos Preliminares.....	75
5.3.2	Otimização da Hidrólise da Pectina utilizando Delineamento Fatorial 2^3	76
5.4	ESTUDOS DE HIDRÓLISE COM MAIORES TEORES DE PECTINA....	85
5.5	ANÁLISE DE CARBOIDRATOS APÓS AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE DA PECTINA	87
5.5.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	87
5.5.2	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-EM).....	88
6.	CONCLUSÕES.....	92
7.	PERSPECTIVAS	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXO I - Identificação de fungos filamentosos.....	109

1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos são polissacarídeos amplamente distribuídos pela natureza, englobando substâncias com estruturas e propriedades funcionais diversas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). Dentre os polissacarídeos mais largamente utilizados na tecnologia de alimentos, encontra-se a pectina, que vem sendo utilizada essencialmente na forma de pó, como ingrediente de grande valor, devido à sua capacidade de atuar como agente geleificante. Estas substâncias podem ser encontradas, em grande quantidade, nas paredes vegetais de frutas, como, por exemplo, em frutas cítricas.

Segundo estimativas da Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR), o Brasil é responsável por aproximadamente 30% da produção de laranja *in natura* e por 60% da produção de suco de laranja no mundo. Na safra de 2012, o Brasil produziu 19 milhões de toneladas de laranja e exportou aproximadamente 5×10^4 toneladas de laranja *in natura* e um milhão de toneladas de suco concentrado de laranja (IBGE, 2012). A produção de suco de laranja gera como resíduos diretos cerca de 8 milhões de toneladas ao ano no país (BATTISON, 2011), que, por sua vez, são ricos em pectina. Apenas uma parte destes resíduos é reaproveitada para alimentação animal, mas a maioria é simplesmente descartada devido aos elevados custos de energia dos processos de secagem e moagem necessários para transformá-las em farelo para complemento de ração animal. No entanto, esse panorama deverá mudar no futuro.

Quando os produtos derivados do petróleo começarem a escassear, poderá ocorrer um aumento na demanda por produtos bioquímicos de biorrefinarias para substituí-los. Portanto, é desejável encontrar novas maneiras de converter os resíduos ricos em pectina em produtos de alto valor agregado, como o ácido D-galacturônico, principal componente das substâncias pécticas e que pode ser obtido por meio da hidrólise da pectina.

A hidrólise da pectina pode ser feita via ácida ou enzimática. As enzimas envolvidas na degradação da pectina são as pectinases (ou enzimas pectinolíticas), que são divididas em grupos principais, de acordo com as suas

funções: as esterases, que catalisam a liberação de metanol, as liases, que catalisam a reação de β -eliminação e as hidrolases que catalisam a quebra da ligação α -1,4 glicosídica. Estas enzimas são produzidas por micro-organismos utilizando técnicas de fermentação submersa (FS) ou de fermentação no estado sólido (FES). Nesta última, o micro-organismo cresce sobre um substrato sólido, normalmente um resíduo agroindustrial, em ausência de água livre. A vantagem da FES é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato. Além do apelo ambiental pela utilização de resíduos, a FES adequa-se perfeitamente ao conceito de biorrefinarias, que pressupõe o uso completo da biomassa vegetal em um processo.

Enzimas pectinolíticas, que podem ser produzidas a partir de resíduos cítricos utilizando a FES, são usadas para a hidrólise da pectina. O produto desta hidrólise gera como principal produto o ácido D-galacturônico, que pode ser utilizado para produzir compostos químicos como o ácido múcico e ácido L-galactônico. O primeiro é o material de partida para síntese química do ácido 2,5 furandicarboxílico (furandicarboxylic acid, FDCA), que é um dos doze compostos químicos de maior valor agregado produzidos a partir de biomassa ('Top Value-Added Chemicals from Biomass'), conforme o Departamento de Energia dos Estados Unidos. O composto FDCA irá provavelmente substituir o ácido tereftálico como monômero para a produção de poliésteres (especificamente o PET) ou poderá ser utilizado em polímeros de coordenação ("coordination polymers") (WERPY E PETERSEN, 2004). O ácido L-galactônico, por sua vez, não é muito utilizado atualmente devido ao seu alto custo. Entretanto, se os custos de produção deste composto pudessem ser reduzidos, ele teria uma grande gama de aplicações. Para se ter uma idéia, este ácido tem propriedades similares às do ácido D-glucônico, que é atualmente aplicado como aditivo em cosméticos, em alimentos (como acidulante), em produtos de limpeza (devido às suas propriedades com agente quelante) e como um aditivo na formulação de concreto (retardador) (RICHARD e HILDITCH, 2009).

Nesse cenário, o presente trabalho propõe o estudo da integração de dois processos para o aproveitamento da pectina de resíduos cítricos: a produção de pectinases por fermentação no estado sólido e a utilização destas enzimas na hidrólise da pectina para produção de ácido D-galacturônico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alta massa molar que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores. Quimicamente, são complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, compostos de unidade de ácido D-galacturônico unidas por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (Figura 1) e parcial ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio.

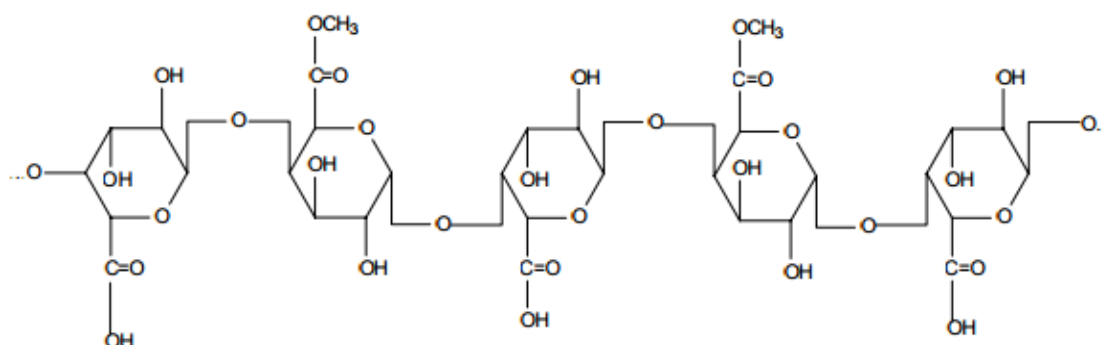


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MOLÉCULA DE PECTINA PARCIALMENTE ESTERIFICADA

Ao contrário das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, sendo polissacarídeos, substâncias pécticas não têm massas molares definidas, sendo que estas variam entre 25 a 360 kDa, como apresentado na Tabela 1 (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). Observa-se que as massas molares médias da pectina de frutas como a maçã e o limão são cerca de 10 vezes maiores que as das peras e ameixas, e cerca de 7 vezes maiores do que as da laranja e da beterraba.

A viscosidade está diretamente relacionada ao volume hidrodinâmico da partícula. Certos fatores alteram a relação entre a massa molar e o poder geleificante, como a presença de cadeias ou grupos laterais, que bloqueiam os grupos funcionais necessários para a geleificação. As características químicas

das substâncias pécticas que influenciam a força do gel são: temperatura, fonte, grau de esterificação, grau de acetilação, massa molar, pH, açúcares e outros solutos e cálcio (WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

TABELA 1 – MASSAS MOLARES DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Fonte	Massas Molares (kDa)
Maçã e limão	200 – 360
Pêra e ameixa	25 – 35
Laranja	40 – 50
Polpa de beterraba	40 – 50

FONTE: SAKAI et al. (1993)

Dispersões de pectina são coloidais, e em função de seu caráter hidrofílico, devido à presença de grupos polares, apresentam a propriedade de envolver grande quantidade de água, produzindo uma solução viscosa. Portanto, a pectina é amplamente utilizada no preparo de geléias, doces de frutas, produtos de confeitaria, sucos de frutas e em outros ramos da indústria de alimentos. As substâncias pécticas também são utilizadas em alimentos, como espessantes, texturizantes, emulsificantes ou estabilizantes (BOWERS, 1992; VRIES, 2004).

Além do emprego em alimentos, substâncias pécticas vêm sendo utilizadas para remover metais tóxicos em soluções aquosas e como agente floculante no tratamento de efluentes, apresentando a vantagem de serem biodegradáveis e atóxicas ao meio ambiente e aos seres humanos (YOKOI et al., 2002). As substâncias pécticas apresentam também aplicação na área médica, agindo na diminuição do colesterol sanguíneo e nos níveis de glicose, além de apresentarem potencial inibitório de crescimento de tumores e metástase (YAMADA et al., 2003), e habilidade de modificar a superfície de materiais hospitalares, bloqueando a aderência de micro-organismos enteropatogenicos, como a *Escherichia coli* (KASTNER et al., 2002; COENEN et al., 2008).

A Figura 2 mostra uma representação esquemática da pectina, que é formada principalmente por três elementos estruturais: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II). HG consiste de uma estrutura de resíduos de ácido D-galacturônico em ligações α -(1→4) axiais,

que pode ser parcialmente metil-esterificada em C-6 e acetil-esterificada em O-2 ou O-3 (KASHYAP et al., 2001). RG-I é um polímero ramificado constituído de cadeias contendo unidades alternadas de ácido D-galacturônico e ramnose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), onde arabinana, galactana e arabinogalactana I e II podem estar presentes como cadeias laterais. RG-II é um complexo polimérico composto de ácido D-galacturônico, ramnose, galactose e outros açúcares (MARTÍNEZ et al., 2010). As ramnogalacturonanas são carregadas negativamente em valores de pH maiores que 5 (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

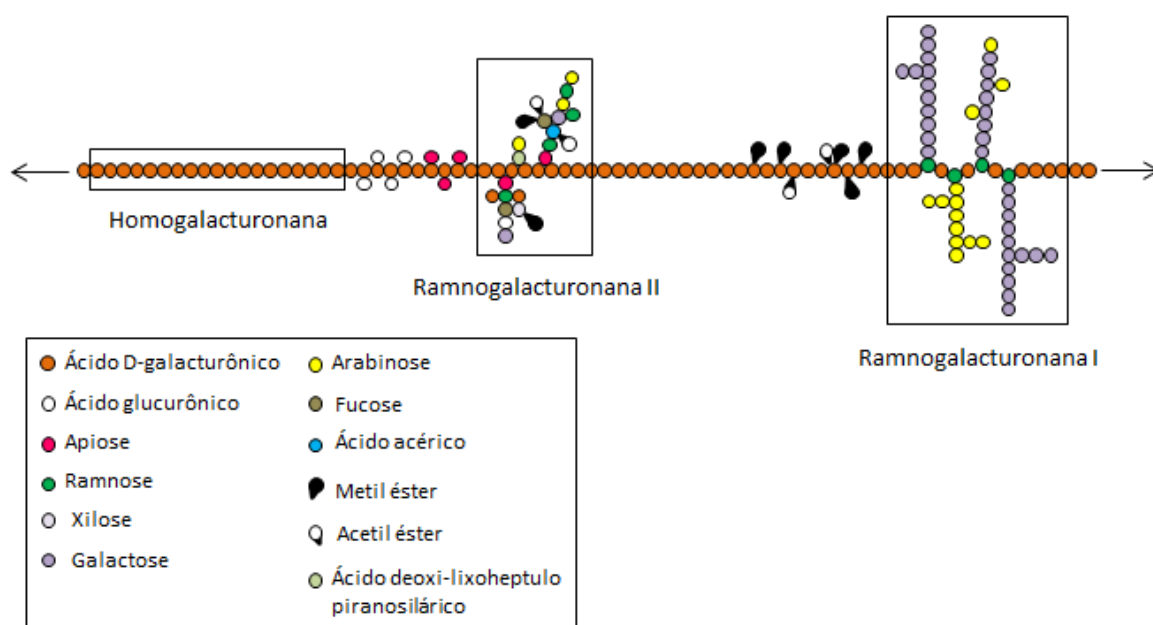


FIGURA 2 – ESQUEMA ESTRUTURAL DA CADEIA DE PECTINA
 FONTE: Adaptado de CANTERI et al. (2012)

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classifica as substâncias pécticas em: protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina, sendo estes três últimos total ou parcialmente solúveis em água (Tabela 2). A classificação é feita de acordo com a solubilidade do complexo em meio aquoso e o seu grau de metilação (KERTESZ, 1951; ALKORTA et al., 1998, PRASSANA et al., 2007; UENOJO e PASTORE, 2007).

TABELA 2 - QUATRO PRINCIPAIS CLASSIFICAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Substância Pécica	Características
Ácido Pécico	Polímero solúvel que contém uma quantidade desprezível de grupos metoxila
Ácido Pectínico	Cadeia de poligalacturonana que contém >0 e <75% de unidades de galacturonato metiladas.
Pectina	Material polimérico no qual pelo menos 75% do grupos carboxila das unidades de galacturonato são metil esterificados.
Protopectina	Substância pécica insolúvel em água e que está presente em tecidos vegetais intactos. Pode ser hidrolisada a pectina ou ácido pécico.

FONTE : Adaptado de Jayani, Saxena e Gupta (2005)

As matérias-primas mais importantes para a extração comercial da pectina constituem-se na polpa de maçã e cascas de frutas cítricas (subprodutos da indústria de sucos), as quais originaram substâncias pécicas de alto grau de metoxilação. Outras fontes, como polpas de beterraba e batata, têm atraído a atenção de pesquisadores, por apresentarem expressivo conteúdo de pectina, porém, com baixo poder de geleificação (TURQUOIS et al., 1999).

A polpa cítrica possui uma quantidade significativa de pectina (Tabela 3, de 12,4 a 28% de sua massa seca); portanto, é bastante valorizada para a comercialização direta da pectina extraída (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

Devido à sua grande e ampla importância, substâncias pécicas têm sido intensamente estudadas há mais de seis décadas. Porém, um melhor conhecimento da estrutura química e da cinética de hidrólise das substâncias pécicas ainda é necessário para o entendimento e desenvolvimento de suas aplicações tecnológicas.

Existe uma significativa heterogeneidade com respeito à massa molar, graus de esterificação e acetilação, no teor e no tipo de ligação de açúcares

neutros, e na distribuição de substituintes e componentes não-urônicos em substâncias pectínicas, dependendo da espécie da planta, do tipo e localização do tecido, do estágio metabólico e do meio ambiente em que a planta está inserida (SAKAI et al., 1993; PEREZ, RODRIGUEZ-CARVAJAL e DOCO, 2003).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DA POLPA DE LARANJA

Componente	% (m/m base seca)
Extrato etéreo	3,9 ± 0,1
Glucose	14,6 ± 0,4
Frutose	15,5 ± 0,5
Sacarose	10,9 ± 0,3
Pectina	14,4 ± 0,3
Proteína	7,9 ± 0,1
Celulose	16,2 ± 0,5
Hemicelulose	13,8 ± 0,3
Cinzas	1,7 ± 0,1
Lignina	1,0 ± 0,02

FONTE: MAMMA, KOURTOGLOU e CHRISTAKOPOULOS (2008)

2.1.1 Pectina como Matéria-Prima em Biorrefinarias

O Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos, NREL, define biorrefinarias como instalações industriais que visam à conversão de biomassa de diferentes fontes em diversos produtos, tais como combustíveis, energia e *commodities* industriais, além de intermediários químicos. São análogas às refinarias de petróleo, mas sustentáveis e ambientalmente corretas em sua concepção (Figura 3).

As biorrefinarias apresentam três características principais: (1) a preocupação com a utilização máxima da biomassa, sendo os resíduos do processo principal utilizados para obtenção de outros produtos; (2) a flexibilidade no que diz respeito às fontes de biomassa que podem ser utilizadas, o que as torna menos sujeitas às flutuações na oferta; e (3) a utilização de matérias-primas provenientes de resíduos agroindustriais ou que não comprometam a área arável destinada à produção de alimentos (KAMM e KAMM, 2007).

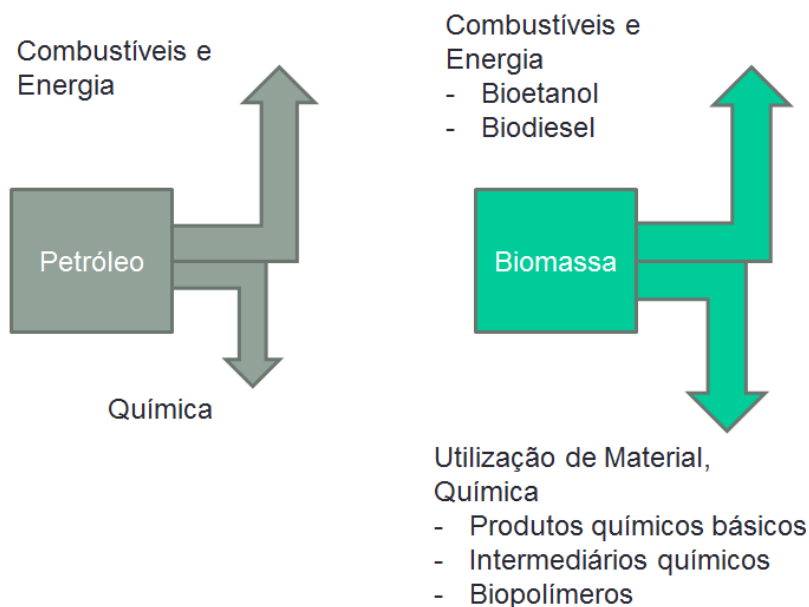


FIGURA 3 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UMA BIORREFINARIA COMPARADA A UMA REFINARIA DE PETRÓLEO

FONTE: Adaptado de KAMM e KAMM (2007)

As matérias-primas para biorrefinarias poderão ter origem em diferentes fontes. Entretanto, sempre que possível, as biorrefinarias deverão utilizar (1) materiais abundantes e de baixo custo, obtidos de fontes primárias, naturais e renováveis, como florestas ou lavouras; ou (2) resíduos da agroindústria, incluindo o processamento de alimentos e outras indústrias que gerem resíduos orgânicos (SINGH e KUMAR, 2007). Dentre estes materiais, podem-se citar materiais lignocelulósicos, como cavacos de madeira e serragem; resíduos ricos em amido, como bagaço de mandioca e farelos de trigo, soja e milho (KING, INDERWILDI e WILLIAMS, 2010); lixo doméstico (OHARA, 2003) e resíduos ricos em pectina, como casca do café, polpa de beterraba, cabeça de girassol e polpa cítrica (LOPEZ, LI e THOMPSON, 2010; LOHRASBI, 2010).

Nesta perspectiva, resíduos ricos em pectina são de grande interesse, pois são produzidos em quantidades significativas pela agroindústria. Além disso, a sua hidrólise não requer processos físico-químicos tão severos quanto aqueles utilizados na hidrólise de resíduos lignocelulósicos. Podem fornecer produtos de alto valor agregado, como a própria pectina purificada e os açúcares resultantes da hidrólise total desses substratos, principalmente o ácido D-galacturônico e a

arabinose (RICHARD e HILDITCH, 2009; MOJZITA et al., 2010; LEIJDEKKERS et al., 2013).

Segundo dados da FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - a produção mundial de laranja durante a safra de 2010/2011 foi de aproximadamente 70,7 milhões de toneladas, das quais 23,9 milhões de toneladas são destinadas ao processamento (FAO, 2012), gerando uma grande quantidade de resíduos industriais. Cerca de 50% da produção mundial de laranja e 80% da brasileira resultam em sucos industrializados. O principal comprador da bebida brasileira é a União Européia, que aumenta significativamente o percentual de importação anualmente. A maior parte das importações mundiais, 85%, é absorvida por apenas três mercados: Estados Unidos, União Européia e Canadá (MAPA, 2011).

Da laranja, além do suco, são extraídos óleos e essências. As cascas de laranja são em parte usadas na alimentação animal, tanto frescas como após armazenamento ou desidratadas. Porém, uma grande quantidade do resíduo fresco é descartada na natureza, como resultado da dificuldade de armazenamento e elevado custo de secagem, causando diversos problemas ambientais (TRIPODO et al., 2004).

2.2 HIDRÓLISE DA PECTINA

2.2.1 Processos químicos

A produção de monossacarídeos pela hidrólise de carboidratos poliméricos é um passo promissor para aumentar o valor deste subproduto da indústria. A polpa cítrica e outros resíduos pécticos podem ser hidrolisados a seus açúcares constituintes pela hidrólise catalisada por ácidos diluídos ou por hidrólise enzimática, onde são liberados principalmente ácido D-galacturônico e outros açúcares de importância industrial, como a arabinose (LEIJDEKKERS et al., 2013). Estes são compostos interessantes para a posterior conversão em *building blocks*, que subsequentemente podem ser transformados em produtos químicos e

materiais de alto valor agregado, tais como poliésteres, poliamidas ou plastificantes (WERPY e PETERSEN, 2004).

A hidrólise ácida é caracterizada por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido clorídrico e sulfúrico, e condições rígidas de pH e temperatura (pH entre 1 e 2 e temperaturas entre 100 a 150°C). Além destes ácidos, que são os mais utilizados, outros são empregados, como os ácidos fórmico e trifluoroacético (TFA), que têm menor desempenho, mas produzem reações mais limpas, ou seja, com menor geração de subprodutos (ANTÔNIO, 2010). Destes ácidos, TFA é o mais indicado para a hidrólise ácida ou combinada (ação de enzimas e do ácido), quando se deseja obter o ácido D-galacturônico intacto e em maior rendimento, já que causa menos danos aos monômeros liberados durante a hidrólise (GARNA et al., 2006).

Na hidrólise ácida da pectina (Figura 4), o oxigênio da ligação glicosídica atua como nucleófilo, ligando-se ao íon hidrogênio do meio, o que o torna um bom grupo de saída. Assim, ocorre a formação de um carbocátion em C-1, que é susceptível ao ataque da água, formando um novo monômero de ácido D-galacturônico.

As condições satisfatórias para a hidrólise ácida de um substrato polissacarídico podem ser encontradas por intermédio de curvas apropriadas, nas quais são fatores variáveis a concentração de ácido da solução, a temperatura e a duração da hidrólise. É no pico máximo que devem ser fixadas as condições ótimas de hidrólise, pois, além desse ponto, há o risco de destruição das unidades de açúcar (SAEMAN et al., 1954). Ou seja, o aumento excessivo da concentração de ácido, do tempo ou da temperatura, para elevar a velocidade de hidrólise da cadeia poligalacturônica, destrói os monômeros de açúcar já liberados, com a formação irreversível de lactonas (Figura 5) (BLAKE e RICHARDS, 1968).

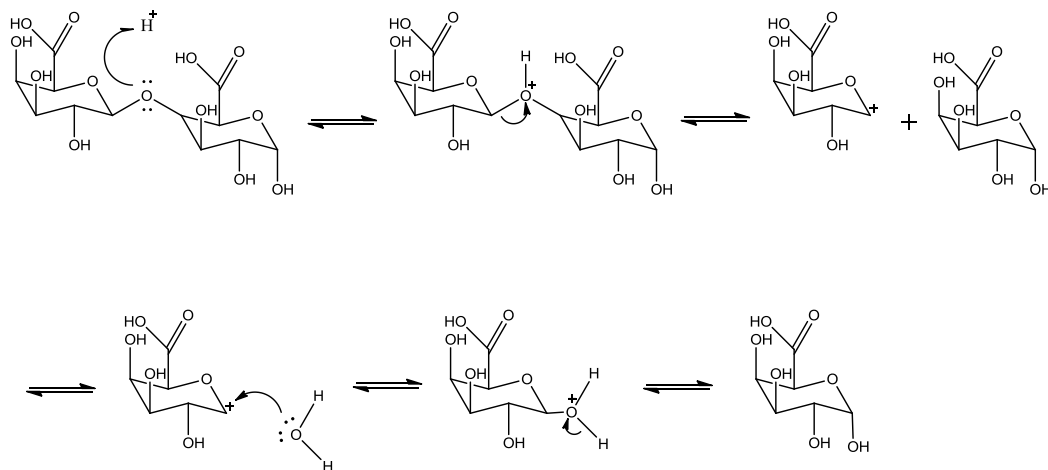


FIGURA 4 – MECANISMO REACIONAL DA HIDRÓLISE DA PECTINA EM MEIO ÁCIDO
 FONTE: Adaptado de VOLLHARDT (2004)

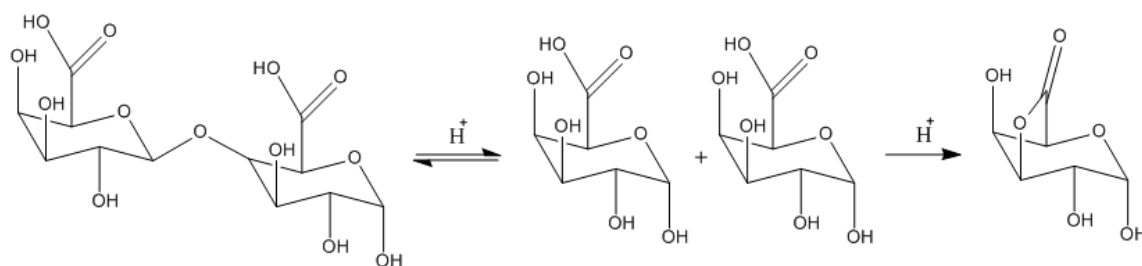


FIGURA 5 – FORMAÇÃO DE LACTONAS EM MEIO ÁCIDO A PARTIR DA PECTINA
 FONTE: Adaptado de VOLLHARDT (2004)

2.2.2 Processos Enzimáticos

Visto que a hidrólise química resulta em elevadas quantidades de efluentes ácidos, consumo de energia substancial, quebra inespecífica de polissacarídeos e degradação dos monômeros liberados, a hidrólise enzimática (Figura 6) é considerada a abordagem mais favorável (LEIJDEKKERS et al., 2013). Um conjunto de enzimas é necessário para a completa degradação da pectina a monossacarídeos, já que oligossacarídeos resistentes são formados, limitando o rendimento da hidrólise (MICARD et al., 1997).

A hidrólise enzimática pode ocorrer de duas maneiras distintas (Figura 6). Nas duas propostas, atuam dois resíduos de ácido carboxílico da enzima e uma unidade de água. No mecanismo A, um ácido carboxílico de uma enzima atua

como ácido e o outro como base. Já no mecanismo B, um atua como ácido e o outro, como nucleófilo. (SILVERMANN, 2010)

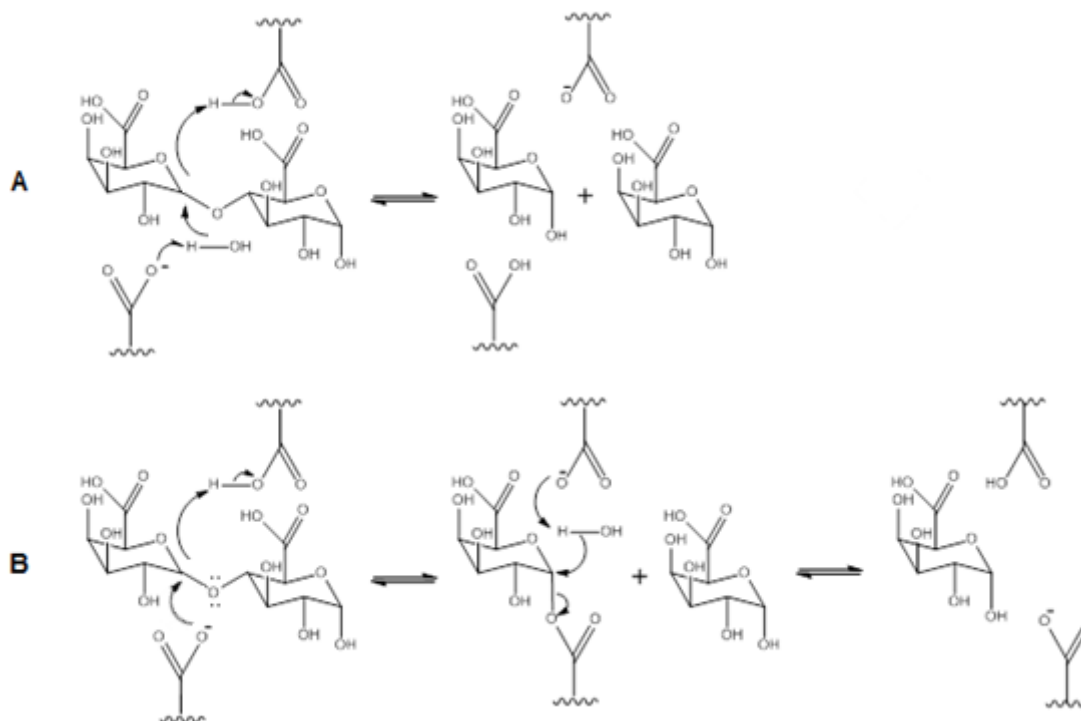


FIGURA 6 – MECANISMO REACIONAL DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA
 FONTE: Adaptado de SILVERMAN (2010)

As enzimas envolvidas na degradação da pectina podem ser classificadas em diferentes categorias, dependendo da sua ação (Figura 7 e 8). As esterases (EC 3.1.1.11) hidrolisam a ligação metiléster nos resíduos de ácido D-galacturônico, liberando metanol. As enzimas depolimerizantes (“depolimerases”) encurtam o comprimento da cadeia e incluem as hidrolases e as liases, que podem atuar aleatoriamente na cadeia (endoenzimas) ou no final da cadeia (exoenzimas). As hidrolases (EC 3.2.1.15) catalisam a hidrólise de ligações $\alpha - 1,4$ e as liases (EC 4.2.2.10) catalisam a β -eliminação. Dentre as hidrolases estão as polimetil-galacturonases e as poligalacturonases (UENOJO e PASTORE, 2007). No entanto, em contraste com as poligalacturonases, as polimetilgalacturonases podem atuar sobre o polímero totalmente metilado (SERRAT; BERMÚDEZ; VILLA, 2002).

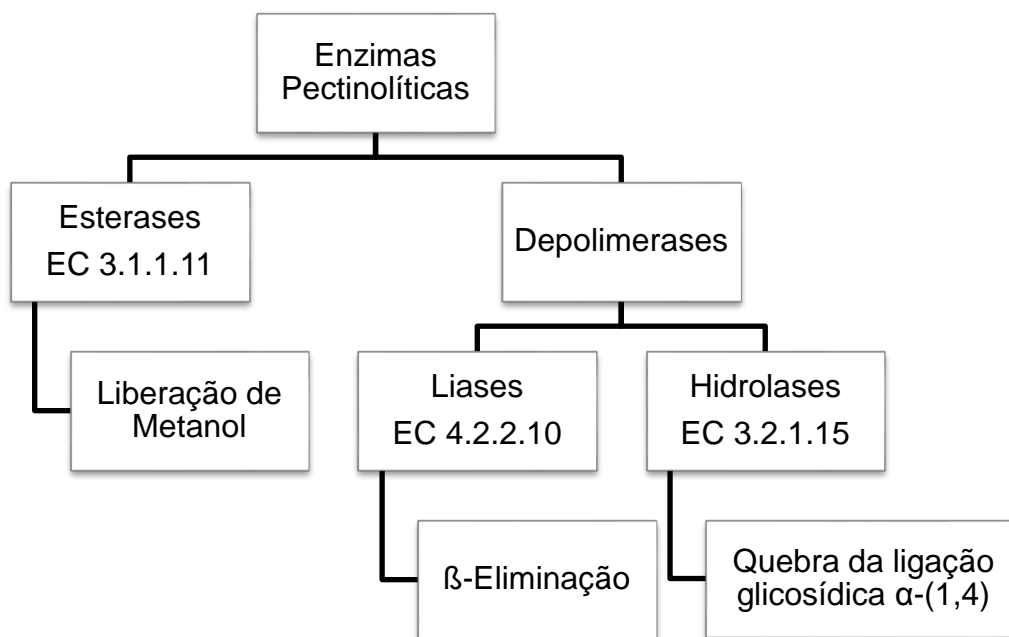


FIGURA 7 – DIVISÃO DE FUNÇÕES DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS
 FONTE: Adaptado de JAYANI, SAXENA E GUPTA (2005)

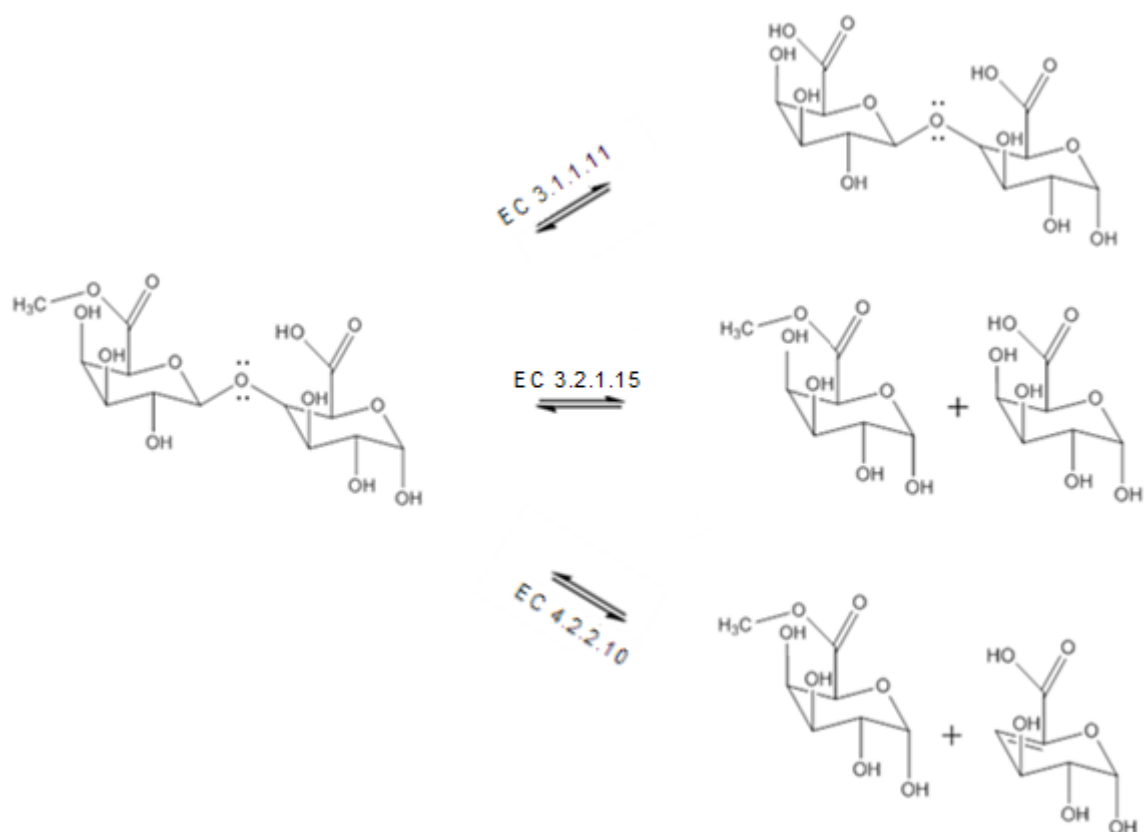


FIGURA 8 – ATUAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE PECTINASES NA ESTRUTURA DA PECTINA
 FONTE : Adaptado de JAYANI, SAXENA E GUPTA (2005)

Pectinases, também conhecidas como poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15), pertencem à família das polissacaridasas que contribuem na hidrólise da pectina de várias plantas (HENRISSAT e BAIROCH, 1993; KERTESZ, 1951). Essas enzimas agem nas regiões HG e RG (Figura 2, página 22) da pectina. Portanto, arabinases e galactanases, que são capazes de degradar as cadeias laterais presentes na estrutura da pectina, não são consideradas pectinases. As pectinases são amplamente distribuídas em plantas superiores, onde estão envolvidas na modificação de substâncias pécticas durante o processo natural de amadurecimento de algumas frutas. Muitas pectinases também são produzidas por fungos como *Aspergillus niger* e *A. oryzae* e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida norvengensis* (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011), sendo *A. niger* o mais utilizado para a produção industrial de enzimas pectinolíticas (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

Para a degradação eficiente da biomassa rica em pectina, além das pectinases, é necessária a ação de outros tipos de enzimas, dentre as quais as celulases, hemicelulases (GROHMANN e BALDWIN, 1992; OBEROI et al., 2012; ZHENG et al., 2012). As celulases e hemicelulases têm papel fundamental na quebra das ligações cruzadas das estruturas polissacarídicas da parede celular e na degradação dos polissacarídeos neutros, como a celulose e hemicelulose, o que expõe mais facilmente a pectina para a atuação das pectinases. Alguns autores utilizaram a seguinte combinação de preparações de enzimas comerciais: Celluclast 1.5 L (celulases e hemicelulases), Novozyme-188 (β -glucosidades) e Pectinex Ultra SPL (pectinases) (TALEBNIA et al., 2008; OBEROI et al., 2012). Esta combinação de enzimas propiciou bons resultados na hidrólise de resíduos ricos em pectina, com 72% de solubilização da matéria seca (TALEBNIA et al., 2008).

Como uma alternativa para o uso de misturas de enzimas comerciais para hidrólise da pectina, tem-se o uso do extrato enzimático bruto de fungos do gênero *Aspergillus*, que conta com todas as enzimas excretadas pelo fungo (RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2007). Diversos estudos de hidrólise enzimática da polpa cítrica utilizaram com sucesso o extrato enzimático bruto de fungos do gênero *Aspergillus* para a hidrólise de pectina para clarificação de sucos e vinhos (RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2007, 2008). Por outro lado, extratos brutos de cultivos de *Aspergillus* contendo pectinases foram empregados na hidrólise de

cascas de laranja, com vistas à produção de açúcares para utilização na produção de etanol, obtendo-se 92% da solubilização da casca de laranja (SOLÍS et al., 2009).

Enzimas pectinolíticas são comercialmente disponíveis e correspondem a aproximadamente 25% das vendas globais do mercado de enzimas (SINGH, RAMAKRISHNA e RAO, 1999). A sua aplicação é, no entanto, dificultada pelo alto custo. Portanto, pré-tratamentos da biomassa com ação de ácidos ou bases vêm sendo aplicados para reduzir a quantidade de enzima necessária, e, conseqüentemente, diminuir o custo do processo enzimático (ZHENG et al., 2012). Além disso, devido ao fenômeno de inibição de enzimas pectinolíticas pelo produto (BÉLAFI-BAKÓ et al. 2007), não é possível utilizar diretamente grandes razões substrato/enzima.

Para evitar o fenômeno de inibição pelo ácido D-galacturônico, aumentar a produtividade e ainda reutilizar as pectinases do processo de hidrólise, alguns autores propuseram a utilização de biorreatores de membranas, onde as moléculas pequenas (como o ácido D-galacturônico) podem passar facilmente pela membrana, e as moléculas maiores (substrato e enzima) ficam retidas. No entanto, a necessidade de manter a concentração de substratos baixa, para não obstruir as membranas, pode aumentar o volume dos biorreatores. Além disso, a fragilidade e o alto custo das membranas dificultariam a viabilização desta técnica na sua aplicação em biorrefinarias (GERGELY, BEKASSY-MOLNAR, & VATAI, 2003, BÉLAFI-BAKÓ et al., 2006; BÉLAFI-BAKÓ et al., 2007).

Apesar dos diversos estudos encontrados sobre a hidrólise da pectina, poucos visam à produção do ácido D-galacturônico como produto de valor agregado, ou intermediário químico (BÉLAFI-BAKÓ et al., 2006; BÉLAFI-BAKÓ et al., 2007; KISS et al., 2009; MOLNÁR et al., 2010). Nestes trabalhos, são estudados sistemas para separação do produto, ou seja, a recuperação do ácido D-galacturônico do meio reacional. De todos os trabalhos citados até aqui nenhum visa o aproveitamento do ácido D-galacturônico como intermediário de síntese. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura tem como objetivo a produção de etanol a partir da sacarificação da pectina (GROHMANN, CAMERON e BUSLIG, 1994; WILKINS, WIDMER e GROHMANN, 2007; ALVIRA et al., 2010; WIDMER, ZHOU e GROHMANN, 2010), sua aplicação na indústria têxtil e de

papel (JACOB et al., 2008) e na indústria de sucos e vinhos (RODRÍGUEZ-NOGALES, ORTEGA e PEREZ-MATEOS, 2008).

2.2.2.1 Condições Reacionais da Hidrólise Enzimática

As condições de hidrólise enzimática da pectina são significativamente mais brandas que as da hidrólise com ácido diluído. As temperaturas operacionais não variam muito, ficando entre 40 a 50 °C e o pH da solução de hidrólise é fixado geralmente entre 4 e 5, pois esta é a faixa de pH adequada para atuação de pectinases. Além disso, o meio ácido favorece a quebra do grupo acetal presente na cadeia poligalacturônica, aumentando as velocidades de conversão da pectina em ácido D-galacturônico.

Outros autores, entretanto, ampliam a faixa de temperatura para atuação das pectinases de 25 a 80 °C (KASHYAP et al., 2001; GOMES et al., 2011). Temperaturas acima de 60 °C, por longos períodos, podem desnaturar as enzimas pectinolíticas (KILARA, 1982). Por outro lado, temperaturas mais altas são interessantes, pois afetam consideravelmente a velocidade de reação catalisada por enzimas, por dois mecanismos: o mecanismo químico, onde a velocidade de reação aumenta devido ao aumento da entropia do meio e, assim, há um aumento do fenômeno de transferência de massas, e o mecanismo associado à desnaturação da enzima pelo aumento da temperatura. Esta tendência foi observada em todos os estudos que investigam o efeito da temperatura sobre a ação das pectinases, principalmente na indústria, em clarificação de sucos e como coadjuvante na extração de óleos (KASHYAP et al., 2001).

Alguns trabalhos de caracterização de pectinases com relação à atividade e estabilidade à temperatura podem ser encontrados na literatura. Moyo et al. (2003) descrevem pectinases produzidas por *Kluyveromyces wickerhamii* apresentando a temperatura ótima de 32 °C. Por outro lado, Mohamed et al. (2006) avaliaram pectinases de *Trichoderma harzianum* e a melhor temperatura foi de 40°C. Outros autores determinaram a mesma faixa de temperatura ótima (40 - 50°C) para pectinases obtidas a partir de *Bacillus sp.* (KOBAYASHI et al., 2001), *Mucor flavus* (GADRE et al., 2003) e *T. reesei* (MOHAMED et al., 2003).

Pectinases obtidas por processos fermentativos utilizando resíduos de indústrias de suco como substrato são estáveis até temperaturas de 50°C; porém, estas enzimas geralmente perdem sua atividade após 20 min nesta temperatura (ZHENG e SHETTY, 2000). Gomes e colaboradores (2011) avaliaram a estabilidade de pectinases de *A. niger*, e verificaram uma melhor atividade a 25°C.

2.2.3 O Ácido D-galacturônico e suas Aplicações

O ácido D-galacturônico (Figura 9), principal constituinte da pectina, com cerca de 75% do total da hidrólise da pectina purificada, é um açúcar ácido (pKa 3,5), que o distingue dos demais açúcares neutros presentes no hidrolisado de pectina cítrica. Pode ser recuperado e comercializado diretamente para a utilização na indústria alimentícia, como agente acidificante e na indústria química como surfactante e agente tensoativo. Este açúcar ácido também pode ser transformado em substâncias de maior valor agregado, por meio da biocatálise ou catálise química, como o ácido múcico (ácido *meso*-galactárico) e ácido L-galactônico (Figura 10) (RICHARD e HILDITCH, 2009; MOJZITA et al., 2010).

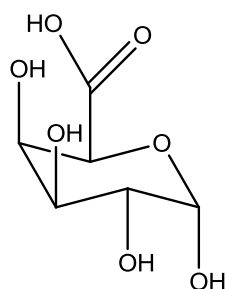


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO

O ácido múcico pode ser convertido diretamente no ácido 2,5 furandicarboxílico (furandicarboxylic acid, FDCA). O FDCA tem grande potencial de substituir o ácido tereftálico, bastante usado na produção de poliésteres, como o tereftalato de polietileno (PET) e o tereftalato de polibutileno (PBT). O PET tem um mercado de aproximadamente 4 bilhões de libras esterlinas ao ano, e o PBT de aproximadamente 1 bilhão. A versatilidade do FDCA também é vista no

número de derivados obtidos por meio de transformações químicas relativamente simples. A redução seletiva pode conduzir a produtos parcialmente hidrogenados, tais como o 2,5-di(hidroximetil)furano, e materiais totalmente hidrogenados, tais como 2,5-bis(hidroximetil)tetrahydrofurano. Ambos os materiais podem atuar como álcoois na produção de poliésteres, e sua combinação com o FDCA levaria a uma nova família de produtos completamente derivados da biomassa (WERPY e PETERSEN, 2004).

O ácido L-galactônico tem seu uso restrito devido ao seu alto custo de produção. Este composto apresenta propriedades similares às do ácido D-glucônico, que tem um mercado bem estabelecido como aditivo em cosméticos, em alimentos (como acidulante), em produtos de limpeza (devido às suas propriedades com agente quelante) e como um aditivo na formulação de concreto (retardador) (RICHARD e HILDITCH, 2009). Além disso, o ácido D-glucônico (ou L-galactônico) pode ser empregado também como material de partida para síntese química do ácido ascórbico (DI MATTEO et al., 2010). Portanto, se houver uma maneira de reduzir os custos de produção do ácido L-galactônico, como por hidrólise de biomassa rica em pectina, este apresentaria uma ampla gama de aplicações.

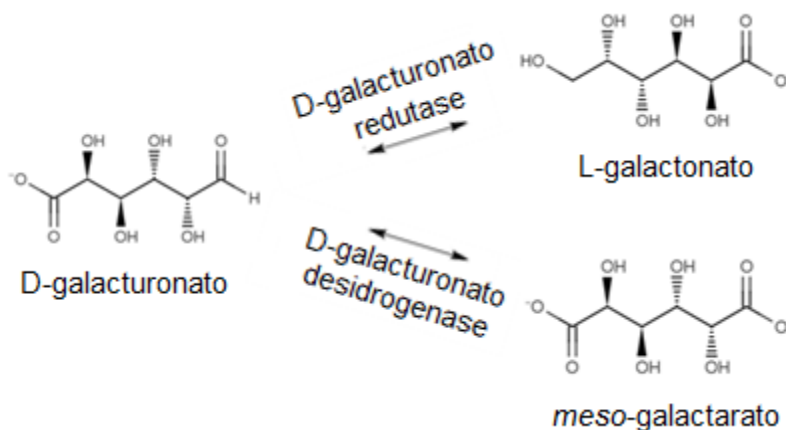


FIGURA 10 - BIOCONVERSÃO DO D-GALACTURONATO A L-GALACTONATO E A MESO-GALACTARATO.

FONTE: Adaptado de MOJZITA, et al. (2010)

O ácido D-galacturônico, portanto, é um material de partida importante, além de apresentar aplicações industriais bem estabelecidas. Encontrar uma rota

de obtenção barata e ecologicamente correta, como por exemplo, em um sistema de biorrefinarias utilizando matérias-primas ricas em pectina, é fundamental.

2.3 PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A fermentação no estado sólido envolve o cultivo de micro-organismos, usualmente fungos filamentosos, na superfície de partículas úmidas de materiais sólidos orgânicos, uma situação na qual os espaços entre as partículas são preenchidos por uma fase gasosa contínua (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIČ, 2006). Os teores de água neste sistema são consideravelmente mais baixos do que em processos de fermentação submersa. Portanto, a utilização da fermentação no estado sólido oferece a possibilidade de minimizar a adição de água e, através disso, otimizar a economia do processo em biorrefinarias (BARON, 2010).

Pectinases utilizadas na hidrólise da pectina podem ser produzidas por fermentação submersa (FS) ou por fermentação no estado sólido (FES). Entretanto, a produção de pectinases por FES apresenta vantagens em relação à FS, particularmente no que diz respeito à minimização do uso de água durante o processo, que é essencial para o desenvolvimento de biorrefinarias. Isto é imperativo quando a biomassa a ser utilizada consistir de material orgânico sólido. Processar estes materiais pelo processo tradicional de fermentação submersa, que tem como característica principal o uso de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, implica na maior exigência de água e, conseqüentemente, na produção de efluentes após a extração do produto final, quando comparada à fermentação em estado sólido (BARON, 2010).

A FES é particularmente apropriada para a produção de enzimas fúngicas, considerando que altos rendimentos são frequentemente obtidos por FES em comparação com a fermentação submersa (COUTO e SANROMAN, 2006), além da produção do metabólito desejado em uma forma mais concentrada, se comparada à FS. Isto foi reportado para o caso da produção de enzimas pectinolíticas por *A. niger* utilizando como substrato farelo de cabeça de

girassol, onde a FES se mostrou mais eficiente do que a FS para a produção de exopectinases (PATIL e DAYANAND, 2006).

2.3.1 Substratos

A seleção de substratos utilizados para a produção de pectinases por FES depende de diversos fatores. Porém, os de maior impacto são o custo e a disponibilidade dos substratos, o que torna a utilização de resíduos agroindustriais bastante atrativa. O meio sólido deve fornecer todos os nutrientes necessários a um bom crescimento celular. Por isso, muitas vezes deve-se enriquecer os substratos escolhidos com soluções nutritivas ou tornar seus componentes mais disponíveis por meio de pré-tratamentos químicos ou físicos. Além disso, pode ser necessário remover compostos que possam agir como inibidores (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

A granulometria do substrato também é um fator determinante da produtividade em um processo de FES. Geralmente, as partículas menores proporcionam uma maior área superficial para o crescimento microbiano; no entanto, se forem pequenas demais pode ocorrer a compactação do substrato, dificultando a aeração do meio. Em contraste, as partículas maiores proporcionam uma melhor eficiência da aeração, devido ao aumento do espaço inter-partículas, que diminui a perda de carga quando o ar é soprado pelo leito, mas que fornece uma razão área superficial/volume menor, o que limita o crescimento microbiano. Neste caso, a difusão de enzimas e produtos de hidrólise tem que acontecer através de distâncias maiores (RAIMBAULT, 1998).

Enzimas pectinolíticas têm sido produzidas por FES utilizando diversos resíduos da agricultura e da agroindústria em escala de laboratório. Estes substratos incluem farelo de trigo (CASTILHO, ALVES e MEDRONHO, 1999), farelo de soja (CASTILHO, MEDRONHO e ALVES, 2000), bagaço de morango (ZHENG e SHETTY, 2000), casca e polpa de café (BOCCAS et al., 1994; ANTIER et al., 1993), cacau (SCHWAN, COOPER e WHEALS, 1997), bagaço de cana (MARTIN *et al.*, 2010; SOLIS-PEREYRA *et al.*, 1993), cabeça de girassol (PATIL e DAYANAND, 2006) e cascas de limão e laranja (GARZÓN e HOURS, 1992; LARIOS, GARCIA e HUITRON 1989; MALDONADO e SAAD, 1998)

Dentre os resíduos agroindustriais utilizados para a produção de pectinases por FES (Tabela 4), o bagaço de laranja e o farelo de trigo se destacam como bons substratos já que são ricos em vitaminas e minerais, além de serem fontes de amido e outros carboidratos e proteínas. Valores atrativos de atividade pectinolítica (70 a 1270 U g⁻¹_{ss}) são obtidos com o uso destes substratos. O bagaço de cana também vem sendo empregado como substrato na FES, já que o seu uso favorece a aeração do meio, e, conseqüentemente, o crescimento do fungo, e a produção de enzimas.

A Tabela 4 exhibe trabalhos de produção de pectinases por FES e lista os principais micro-organismos, substratos, composição da solução salina e condições de cultivo utilizadas

2.3.2 *Micro-organismos produtores de pectinases*

Muitos micro-organismos, especialmente fungos filamentosos, são capazes de produzir pectinases. Os micro-organismos mais utilizados para a produção de pectinases são fungos filamentosos mesófilos do gênero *Aspergillus* (Tabela 4), principalmente das espécies *A. niger* (ZHONG-TAO *et al.*, 2009; TASKIN *et al.*, 2008; MAMMA, KOURTOGLOU e CHRISTAKOPOULOS, 2008; PATIL e DAYANAND, 2006), *A. carbonarius* (SINGH, RAMAKRISHNA e RAO, 1999), *A. sojae* (USTOK, TARI e GOGUS, 2007), *A. oryzae* (FONTANA, POLIDORO e DA SILVEIRA, 1989; MALVESSI e SILVEIRA, 2004; LINDE *et al.*, 2007; HEERD *et al.*, 2012).

Aspergillus oryzae é um fungo filamentoso não-patogênico (GRAS – *Generally recognized as safe*), utilizado principalmente na culinária chinesa e japonesa para produção de produtos fermentados. É bastante utilizado na sacarificação de arroz e outros cereais para a produção de bebidas alcoólicas como *Huangjiu* e saquê. Genes extras de *A. oryzae* estão relacionados com a secreção de enzimas hidrolíticas, metabolismo de aminoácidos e transportadores de captação de açúcares e aminoácidos, o que suporta a idéia de que *A. oryzae* é um micro-organismo ideal para processos fermentativos.

A utilização de micro-organismos do gênero *Aspergillus* resulta em uma boa produção de pectinases com valores de atividade variando entre 10 e 1270 U g⁻¹_{ss} (Tabela 4), em tempos de fermentação de até 120 h. Porém, existe um grande problema na comparação de resultados encontrados na literatura, devido à ausência de padronização quanto ao método de dosagem utilizado e definição de atividade enzimática. Parâmetros determinantes que influenciam o valor de atividade são: o tipo e a concentração de substrato, a temperatura e pH do meio, e o tempo de incubação durante o ensaio.

TABELA 4 – PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (Continua)

Micro-organismo	Substrato	Condições de cultivo	Sistema	Suplementação da solução umidificadora	Atividade máxima (U g ⁻¹ ss)	Produtividade (U g ⁻¹ h ⁻¹)	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i> MTCC 4163	Farelo de trigo	pH: 5 Umidade: 60% 50°C 72 h	Erlenmeyer	Extrato de levedura 5%, sacarose 5%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5%	1270	18	PHUTELA <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus carbonarius</i> CFTRI 1047	Farelo de trigo	pH: - Umidade: 60% 30°C 77 h	Erlenmeyer	não utilizou	480	6	SINGH <i>et al.</i> (1999)
<i>Aspergillus niger</i> Ege-K-730	Farelo de trigo	pH: - Umidade: 60% 30°C 48 h	Erlenmeyer	não utilizou	390	8	TASKIN <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus niger</i> BTL	Casca de laranja livre de sólidos solúveis	pH: 5 Umidade: 90% 30°C -	Erlenmeyer	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1%, K ₂ HPO ₄ 0,3%, CaCl ₂ .2H ₂ O 0,05% MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05%	135	-	MAMMA <i>et al.</i> (2008)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	Bagaço de cana, farelo de trigo e bagaço de laranja (1:2:2)	pH: - Umidade: 70% 45°C 48 h	Erlenmeyer	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1%, MgSO ₄ .7H ₂ O 1%	108	2	MARTIN <i>et al.</i> (2010)

TABELA 4 – PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (Continuação)

Micro-organismo	Substrato	Condições de cultivo	Sistema	Suplementação da solução umidificadora	Atividade máxima (U g ⁻¹ ss)	Produtividade (U g ⁻¹ h ⁻¹)	Referência
<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	Farelo de trigo e polpa cítrica (1:1)	pH: - Umidade: 80% 28°C 336 h	Erlenmeyer	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,1%	71,2	0,2	SILVA <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus sojae</i> ATCC 20235	Farelo de trigo e pó de casca de laranja (7:3)	pH: - Umidade: 120% - 120 h	Erlenmeyer	NaCl 0,5%, KCl 0,5%, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,0015%, KH ₂ PO ₄ 0,006%, MgSO ₄ 0,005%, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,0012%, MnSO ₄ ·H ₂ O 0,0015%	33,4	0,3	HEERD <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Bagaço de Laranja e bagaço de cana (9:1)	pH: - Umidade: 85% 30°C 24 h	Erlenmeyer	K ₂ HPO ₄ 0,3%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,3%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5%, KCl 1%, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,009%	12	0,5	BARON (2010)
<i>Aspergillus niger</i> DMF 27	Cabeça de girassol seca sem sementes	pH: - Umidade: 60% 30°C 96 h	Garrafas de vidro	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5%, KH ₂ PO ₄ 0,5% e FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,0005%	10,1	0,1	PATIL <i>et al.</i> (2006)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que é possível obter-se ácido D-galacturônico na hidrólise enzimática da pectina e que a literatura atual carece de trabalhos que utilizam complexos enzimáticos obtidos por FES para obtenção deste ácido, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um método de hidrólise da pectina cítrica utilizando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Selecionar micro-organismo produtor de pectinases e otimizar a produção da enzima por FES, pelo estudo dos meios e condições de cultivo;
- Adequar e otimizar o método de dosagem de atividade pectinolítica diretamente no sólido fermentado liofilizado, sem extração da enzima;
- Caracterizar as pectinases produzidas com relação à atividade, estabilidade à temperatura, à secagem, ao pH e ao armazenamento;
- Otimizar a hidrólise de pectina cítrica utilizando o sólido fermentado contendo pectinases, verificando os efeitos do pH, da temperatura e da concentração de substrato;
- Identificar e caracterizar outros carboidratos, além do ácido D-galacturônico, presentes no hidrolisado, cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química e no Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática (LTFE) do Departamento de Bioquímica, ambos da Universidade Federal do Paraná.

4.1 REAGENTES, MATERIAIS E MEIOS DE CULTIVO

A pectina cítrica utilizada nos ensaios foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), e apresentou um teor mínimo de ácido D-galacturônico de 74%, conforme informação do fabricante. Os padrões utilizados em CLAE (Arabinose, Frutose, D-galactose e ácido D-glucurônico), foram obtidos da Sigma-Aldrich com teor mínimo de 98%. O ácido 3,5-dinitrossalicílico utilizado nos ensaios de determinação de atividade enzimática foi adquirido da Vetec (Duque de Caxias, RJ), com grau de pureza de 99%. O ácido D-galacturônico (Fluka - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) utilizado nas curvas analíticas, tanto em métodos espectrofotométricos quanto cromatográficos, apresentou pureza mínima de 97%. Os sais utilizados no meio de cultivo foram todos de padrão analítico obtidos da Synth (Diadema, SP). O meio de BDA (Batata Dextrose Agar), utilizado para o crescimento de esporos, foi obtido da HIMEDIA (Mumbai, India). Os demais reagentes utilizados foram de padrão analítico e tiveram o grau de pureza requerido no experimento.

O bagaço de laranja, proveniente da extração do suco, foi obtido em lanchonetes locais (Curitiba, PR). O farelo de trigo foi adquirido no Mercado Municipal de Curitiba e o bagaço de cana de açúcar foi fornecido pela Indústria Melhoramentos (Jussara, PR). O bagaço de cana *in natura* foi peneirado para obtenção de partículas entre 1,7 e 1,2 mm e seco a 55-60 °C em estufa por 24 h. O bagaço de laranja, após lavagem com água à temperatura ambiente por 3 vezes, foi seco em estufa de circulação de ar a 60 °C por 72 h e triturado em moinho de facas, utilizando peneira de 6 mm, com posterior reclassificação entre 1,7 e 1,2 mm. O farelo de trigo foi utilizado na forma adquirida.

4.2 PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.2.1 *Micro-organismos*

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram os fungos filamentosos *Aspergillus niger* CH4, *A. niger* AW96, *A. niger* AD96, *A. niger* ATCC 1015. Além destes, foi utilizada uma nova cepa isolada da fruta do maracujá (BIZ, 2012). Esta cepa foi enviada para caracterização no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP) e foi identificada como *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 (ANEXO I), também chamada de *A. oryzae* MV, neste trabalho.

As linhagens *A. niger* CH4, *A. niger* AW96 e *A. niger* AD96 foram isoladas da casca de café, e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Gustavo Viniegra-González, da *Universidad Autonoma Metropolitana de Iztapalapa*, México. A linhagem *A. niger* ATCC 1015 foi gentilmente cedida pelo pesquisador Peter Richard da VTT (*Technical Research Centre of Finland*), Finlândia.

4.2.2 *Manutenção dos Micro-organismos*

Para manutenção, os esporos dos micro-organismos foram inicialmente inoculados em tubos contendo o meio BDA e incubados a 30 °C durante três dias. Após esse período, os esporos foram recobertos com óleo mineral estéril e armazenados a 4 °C, por até três meses, antes de um novo repique. Além disso, foram coletados esporos de cada linhagem com uma solução estéril de glicerol 15% (v/v), que foram então mantidos a -20 °C.

4.2.3 *Preparo da Suspensão de Esporos*

Para o preparo da suspensão de esporos, as diferentes cepas foram crescidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BDA,

durante três dias, em estufa para cultura bacteriológica ECB 1.3 Odontobrás (Ribeirão Preto, SP) a 30 °C. A coleta dos esporos foi feita com a adição de 20 mL de solução salina ao frasco e raspagem dos esporos com um bastão de vidro. A suspensão de esporos foi filtrada através de um funil recoberto com tecido perfurado (tule) e a contagem de esporos da solução resultante (filtrado) foi feita em câmara de Neubauer, observada em microscópio óptico utilizando-se um aumento de 400X.

4.2.4 Cultivos em Estado Sólido

Os substratos dos cultivos de FES consistiram de uma mistura de 30% (m m⁻¹) de bagaço de cana com 70% (m m⁻¹) de bagaço de laranja lavado ou não lavado, e farelo de trigo. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 5 g de mistura de substratos. Todos os materiais e a solução salina utilizados nesta etapa foram esterilizados em autoclave a 120 °C, 1,2 kgf/cm², por 15 min. O volume da suspensão de esporos necessário para o inóculo foi determinado para se obter uma concentração final de 10⁷ esporos por grama de substrato seco (esporos g⁻¹_{ss}). A umidade dos substratos foi fixada em 70% nos experimentos iniciais, utilizando a solução salina de umidificação (item 4.2.5). O volume da suspensão de esporos e a umidade intrínseca dos substratos foram descontados do volume de solução salina necessário para atingir 70% de umidade. Os frascos foram incubados em estufa para cultura bacteriológica a 30 °C.

A produção de pectinases foi determinada nos extratos do sólido fermentado ou diretamente no sólido fermentado liofilizado, pela dosagem de açúcares redutores resultantes da hidrólise da pectina, utilizando o método que utiliza o reagente DNS (MILLER, 1959), a partir de uma curva analítica com o ácido D-galacturônico. A atividade foi expressa como unidades por grama de sólido fermentado seco (U g⁻¹_{ss}).

A umidade inicial dos substratos foi determinada em uma balança de infravermelho (Gehaka), utilizando 1,0 g de amostra.

4.2.5 Solução Salina de Umidificação

Para o ajuste da umidade do meio de cultura de FES e para a coleta de esporos foi preparada uma solução salina a pH 7,0 contendo ($m V^{-1}$): K_2HPO_4 0,3%, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5%, KCl 1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,009% (BARON, 2010).

4.2.6 Obtenção dos Preparados Enzimáticos

Neste trabalho, foram utilizados dois preparados enzimáticos. O extrato bruto contendo o complexo enzimático, obtido por extração do sólido fermentado com tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,5 (como descrito a seguir) e o sólido fermentado liofilizado contendo atividade pectinolítica.

4.2.6.1 Preparo do Extrato Enzimático

A extração das pectinases do sólido fermentado foi realizada com 100 mL de tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,5, para cada 5 g de sólido fermentado, em agitador orbital TE-42I Tecnal (Piracicaba, SP) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm, durante 30 min. Após este período, o material foi filtrado em gaze e prensado manualmente para obtenção do extrato bruto, que foi centrifugado a $2200 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade pectinolítica pelo método que utiliza o reagente DNS (Item 4.7.1).

4.2.6.2 Preparo do Sólido Fermentado Liofilizado

Para obtenção do sólido fermentado liofilizado, após o pico máximo de produção de pectinases, o sólido úmido foi liofilizado em liofilizador Jouan LP3[®] modelo 60, durante 24 h, a 0,1 mbar e $-45 \text{ }^\circ\text{C}$. O sólido fermentado liofilizado foi armazenado em sacos plásticos e mantido em refrigerador a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A atividade

pectinolítica do sólido liofilizado foi determinada por dosagem de açúcares redutores (DNS, 4.7.2), resultantes da hidrólise da pectina, pelo procedimento desenvolvido neste trabalho. Para comparação, a dosagem da atividade foi também feita no extrato bruto do sólido liofilizado, preparado como descrito no item 4.2.6.

4.3 ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE DOSAGEM DE ATIVIDADE DE PECTINASES POR ADIÇÃO DIRETA DO SÓLIDO FERMENTADO AO MEIO REACIONAL

A dosagem de atividade de pectinases produzidas por FES relatadas na literatura normalmente é feita nos extratos brutos obtidos de sólidos fermentados. Entretanto, a dosagem por adição direta do sólido fermentado ao meio reacional, sem passar pela etapa de extração, pode trazer as vantagens de dispensar esta etapa e representar mais adequadamente a atividade real do sólido fermentado, uma vez que as enzimas podem não ser totalmente extraídas do sólido. A fim de se determinar a atividade enzimática no sólido fermentado liofilizado, por adição direta, foi desenvolvido um procedimento baseado no método de hidrólise da pectina que utiliza o reagente de cor DNS (MILLER, 1959).

4.3.1 Otimização do Método de Dosagem Direta no Sólido Fermentado Liofilizado

Na literatura, há uma grande variação dos métodos de extração do complexo enzimático contendo pectinases após a fermentação em estado sólido, sendo que a maioria usa água ou tampão acetato na extração. Neste trabalho, o primeiro ensaio realizado para a determinação da atividade, foi a verificação da influência do pH na atividade pectinolítica no sólido. Para isso foi testada, no início do procedimento de dosagem de atividade no sólido fermentado, a adição de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ a pH 4,5, água ou água com pH ajustado para 4,5 com ácido acético.

Os ensaios de otimização subsequentes foram realizados em tubos Falcon de 15 mL. Inicialmente, foram testadas diferentes concentrações de pectina (0,5 a 2%, m V⁻¹), tempos (5 a 15 min) e temperaturas de incubação (35 a 65 °C). Foi realizado um controle negativo, incubando-se somente o sólido com tampão e adicionando-se a pectina no tubo de DNS, após a transferência do meio incubado.

Na melhor condição selecionada na etapa anterior, avaliou-se a massa de sólido fermentado (20 a 60 mg) e o pH do meio com tampão ácido acético/acetato (4,0 a 5,0).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

4.4.1 *Efeito do Tipo de Secagem*

Para investigar o efeito da secagem do sólido fermentado na atividade pectinolítica foram comparados dois métodos de secagem diferentes: (1) por liofilização, que vinha sendo utilizado até esta etapa, e (2) a secagem por fluxo de ar. Esta última foi conduzida em um sistema fechado composto por duas colunas de PVC integradas, ambas com 4,3 cm de diâmetro e 30 cm de altura, uma preenchida com sílica ativada e outra com 15 g de sólido fermentado úmido. O fluxo de ar foi feito em sentido ascendente, com corrente de ar proveniente de um compressor em temperatura ambiente, pela coluna de sílica para desumidificação do ar e em seguida pela coluna de sólido fermentado, sendo este processo mantido por 2 horas.

A liofilização foi realizada em um liofilizador Jouan LP3[®] modelo 60, a 0,1 mbar e -45 °C, variando-se o tempo de secagem (de 18 a 24 h). A atividade foi determinada pelo método do DNS diretamente no sólido, e expresso em atividade relativa (%) ao sólido fermentado úmido.

4.4.2 *Efeito da Trituração do Sólido Fermentado na Atividade Pectinolítica*

Devido à heterogeneidade do tamanho das partículas do substrato utilizado nos cultivos em estado sólido, mesmo após a sua classificação, estudou-se a influência do tamanho das partículas do sólido fermentado liofilizado na atividade pectinolítica. Para o estudo deste efeito, separaram-se quatro frações de 3 g do sólido, e cada fração foi triturada em liquidificador por diferentes tempos (de 0,5 a 3 min). Para determinar a atividade pectinolítica em cada uma das condições, foi utilizado o método de dosagem direta no sólido ao meio reacional do método de DNS.

4.4.3 Estabilidade ao pH no Meio

A liberação de ácido D-galacturônico no meio, como resultado da hidrólise da pectina, pode modificar o pH do meio. Portanto, foi verificado o efeito do pH do meio na atividade pectinolítica do sólido. Para isto, o sólido fermentado liofilizado foi incubado em tampão com valores de pH entre 3 e 6, a 30 °C. Após 1 h de incubação, o pH do meio foi ajustado para 4,5 e a atividade do sólido foi determinada pelo método de dosagem de atividade direta no sólido fermentado liofilizado (Item 4.7.1).

4.4.4 Estabilidade à Temperatura

De acordo com a literatura, pectinases podem sofrer desnaturação em temperaturas superiores a 50 °C (ORTEGA et al., 2004). Entretanto, esta informação varia de acordo com a procedência da enzima e com o método de dosagem, e não pode ser generalizada. Portanto, foi determinada a estabilidade do complexo enzimático presente no sólido fermentado liofilizado frente a diferentes temperaturas. Para tal, o sólido fermentado foi incubado em diferentes temperaturas (de 30 a 50 °C) com tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ a pH 4,5. Após definidos tempos de incubação, foi determinada a atividade pectinolítica residual no sólido.

4.4.5 *Inibição pelo Produto*

O efeito do produto liberado na atividade da enzima foi avaliado adicionando-se concentrações conhecidas de ácido D-galacturônico no início da reação de hidrólise da pectina, no método de dosagem de atividade. Para tal, pesou-se 2 g de sólido fermentado liofilizado, adicionou-se 25 mL de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ a pH 4,5 contendo azida sódica e 25 mL de solução de pectina 4% (m V⁻¹), resultando numa concentração de pectina no meio de 2%. Os resultados foram obtidos por quantificação em CLAE (Item 4.7.3), descontando-se o teor de ácido D-galacturônico adicionado.

4.4.6 *Estabilidade ao Armazenamento*

Para saber se o sólido fermentado liofilizado se manteria estável, armazenou-se o sólido, após liofilização, em um saco plástico transparente a 4 °C ao abrigo de luz, durante quatro meses. A atividade pectinolítica foi verificada semanalmente, utilizando-se o método de dosagem de atividade no sólido liofilizado.

4.5 HIDRÓLISE DA PECTINA CÍTRICA PARA PRODUÇÃO DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

4.5.1 *Estudos Preliminares*

Para verificar a produção de ácido D-galacturônico a partir da pectina utilizando o sólido fermentado, realizou-se uma cinética de hidrólise em frascos Erlenmeyer de 125 mL agitados em agitador orbital TE-42I Tecnal (Piracicaba, SP). Para tal, adicionaram-se 2 g de sólido fermentado liofilizado a 25 mL de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, com 0,02% (m V⁻¹) de azida sódica (para impedir o crescimento do micro-organismo e consumo do produto liberado), e 25 mL de

solução de pectina 4% ($m V^{-1}$), gerando uma concentração de pectina no meio de 2% ($m V^{-1}$). Foram realizados dois controles negativos: um, com o sólido fermentado liofilizado e outro com o sólido fermentado liofilizado autoclavado a 120 °C por 15 min, para desnaturação das enzimas. Para ambos os controles, foram pesados 2 g de cada sólido, sendo estes adicionados a 25 mL de tampão acetato com 0,02% ($m V^{-1}$) de azida sódica e 25 mL de água destilada. Os frascos foram agitados a 30 °C ou a 50 °C, 180 rpm por 72 h, sendo retiradas alíquotas em tempos determinados. As amostras foram fervidas por 5 min para desnaturação das enzimas e filtradas em membrana de 0,45 μm para análise em CLAE (Item 4.7.3).

4.5.2 Otimização da Hidrólise da Pectina utilizando Delineamento Fatorial 2^3

Depois de realizados os estudos prévios de produção do ácido D-galacturônico a partir da hidrólise da pectina em baixas concentrações (2%, $m V^{-1}$), foi realizada uma otimização do processo, visando, principalmente, aumentar o teor de pectina no meio. Para isso, realizou-se um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, tendo como variáveis a temperatura (T), teor de pectina (P) e massa de sólido fermentado liofilizado (S).

Os ensaios do delineamento fatorial foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL. As soluções de pectina foram preparadas, nas concentrações requeridas no experimento, com 25 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L^{-1} contendo azida sódica e 25 mL de água destilada, gerando um volume final de 50 mL. Às soluções resultantes foi adicionado o sólido fermentado e a mistura foi incubada em agitador orbital a 180 rpm por 72 h. Foi realizado um controle negativo, incubando-se somente o sólido com 25 mL de tampão acetato com 0,02% ($m V^{-1}$) de azida sódica e 25 mL de água destilada. Após os tempos de hidrólise (72 h), alíquotas de 3 mL foram removidas e transferidas para tubos Falcon, fervidas por 10 min, centrifugadas a 2200 $\times g$ por 5 min e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μm para análise em CLAE.

Para medir a influência de cada variável na reação, foi feito o cálculo do efeito de cada uma delas na resposta estudada. Para tal, fez-se o uso do esquema de sinais (+1, 0 e -1), multiplicando-os um a um para obter os resultados

correspondentes aos coeficientes de contraste atribuídos aos efeitos principais e secundários. Em seguida, procedeu-se à somatória dos valores, respeitando os sinais atribuídos e o resultado foi dividido por quatro, que corresponde ao número total de experimentos ($b^2 = 8$) dividido por 2 (Equação 1).

$$EP = \frac{2(\sum y^+ - \sum y^-)}{b^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

EP = Efeitos principais

b^2 = número total de experimentos

y^+ = níveis máximos dos parâmetros

y^- = níveis mínimos dos parâmetros

Os dados experimentais foram analisados pela regressão polinomial de segunda ordem, representada pela Equação 2.

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{kij} x_i x_j \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Y = variável-resposta

β_{k0} , β_{ki} , e β_{kij} = coeficientes e

x_i e x_j = variáveis independentes não codificadas

O modelo matemático foi testado para a falta de ajuste pelo teste F a partir da análise de variância (ANOVA), usando o programa STATISTICA (Data Analysis Software System) versão 10.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO HIDROLISADO

As análises de composição monossacarídica do hidrolisado da pectina cítrica por CCD e CG-EM foram realizadas utilizando como amostra o sobrenadante da hidrólise, obtido por incubação de 12 g de sólido fermentado e 20% ($m V^{-1}$) de pectina, após 72 h de reação. Após a incubação, o sobrenadante das reações foi separado por centrifugação a 2200xg, seguindo-se a secagem em liofilizador Jouan LP3[®] modelo 60, a 0,1 mbar e -45 °C por 24 h.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação de Atividade de Pectinases

A atividade de pectinases no extrato enzimático é baseada no aumento dos grupos redutores formados por ação da enzima na pectina cítrica. Esta metodologia foi aplicada para a determinação da atividade nos extratos brutos do sólido fermentado e nos sólidos fermentados liofilizados, preparados como descrito em 4.2.6.

Para a determinação nos extratos (Figura 11-A), foram adicionados, em tubos de ensaio de 10 mL, 0,25 mL de solução de pectina cítrica 0,5% ($m V^{-1}$) preparada em água destilada. Em seguida, foram adicionados 0,25 mL de extrato enzimático. Após homogeneização, os tubos foram transferidos para um banho-maria a 37 °C por 40 min. Adicionou-se 0,5 mL do reagente de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e, após homogeneização, a solução foi fervida por 5 min. Os tubos foram então transferidos para um banho de gelo, e a eles adicionaram-se 4 mL de água destilada. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata.

Nos ensaios de controle, o extrato bruto foi transferido aos tubos contendo DNS e em seguida foi adicionada a solução de pectina cítrica. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido D-galacturônico por min, nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos como unidades por grama de sólido fermentado ($U g^{-1}_{ss}$), e obtidos utilizando a Equação 3.

$$A = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{controle}) \times dil \times vol}{\varepsilon \times t \times m \times V} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

A= atividade ($U\ g^{-1}_{ss}$)

$Abs_{amostra}$ = absorbância da amostra

$Abs_{controle}$ = absorbância do controle

dil = diluição do extrato enzimático

vol = volume total em mL do extrato enzimático

ε = coeficiente de extinção molar ($0,0933\ mL\ \mu mol^{-1}\ cm^{-1}$; 540 nm)

t = tempo de reação (40 min)

m = massa de substrato seco utilizado na fermentação (g)

V = volume da solução enzimática para o extrato bruto ou massa de sólido fermentado liofilizado (mL ou g)

Para determinação da atividade do sólido fermentado liofilizado (Figura 11-B), pesaram-se 20 mg das amostras em tubos Falcon de 15 mL, às quais foram adicionados 1,6 mL de tampão acetato $0,2\ mol\ L^{-1}$ em pH 4,5 e 1,6 mL de solução de pectina 0,5% ($m\ V^{-1}$). Em seguida, realizou-se a hidrólise a $37\ ^\circ C$, por incubação das amostras em banho-maria. Ao final de 40 min foram retiradas amostras de 500 μL , que, após centrifugação a $2200 \times g$ por 5 min foram colocadas em tubos de ensaio de 10 mL contendo 500 μL de solução de DNS. A cada tubo adicionaram-se 4 mL de água destilada e, após homogeneização, a absorbância das amostras foi lida a 540 nm. Nos ensaios-controle, o sólido fermentado foi incubado somente com tampão, e a solução de pectina foi adicionada ao tubo de ensaio antes da incubação a $100\ ^\circ C$, para evitar a reação de hidrólise. Os resultados foram expressos como unidades por grama de sólido fermentado ($U\ g^{-1}_{ss}$), e obtidos utilizando a Equação 3.

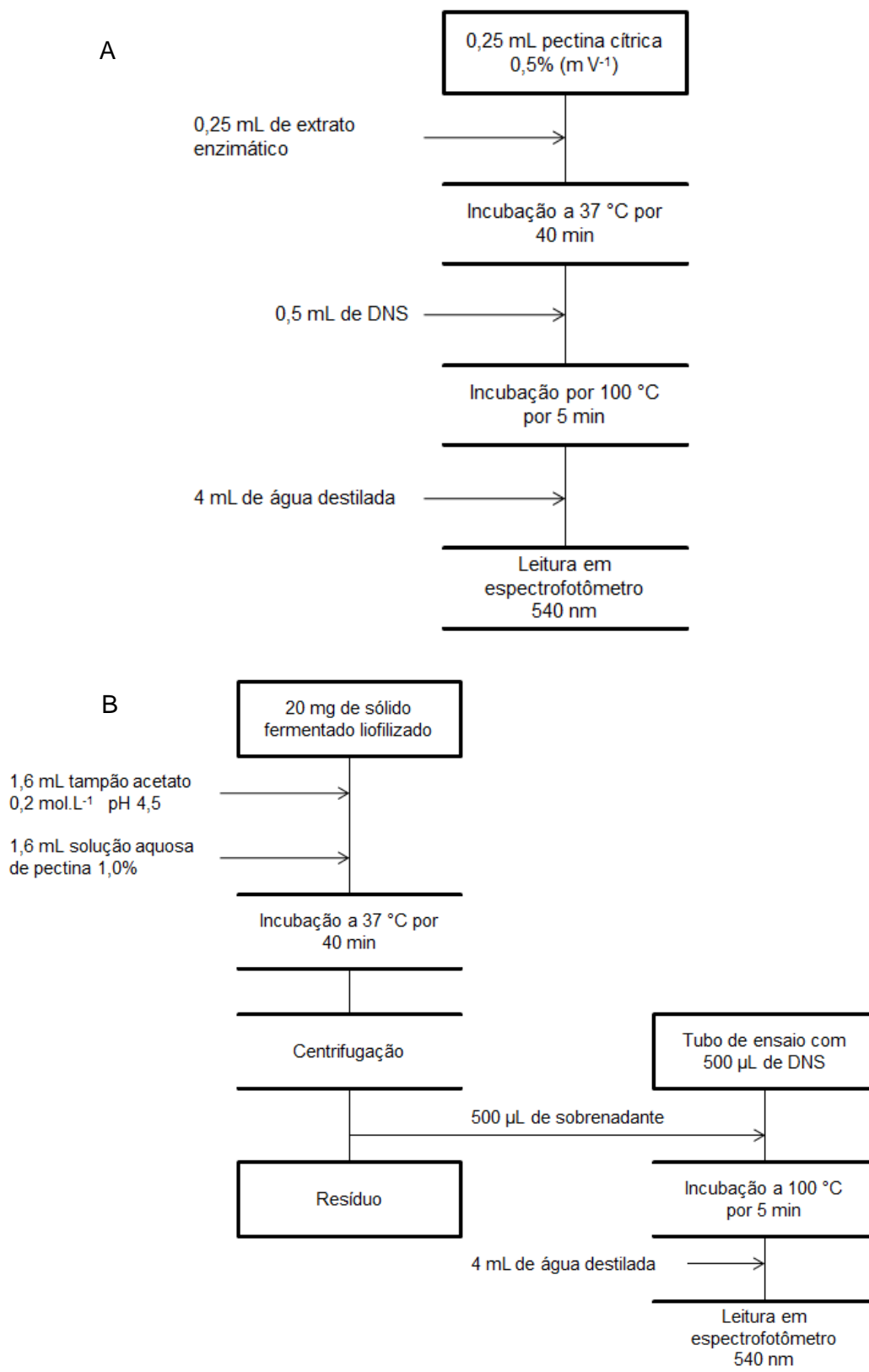


FIGURA 11 – FLUXOGRAMAS DO PROCEDIMENTO PARA DOSAGEM DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA NO EXTRATO BRUTO (A) E POR ADIÇÃO DIRETA DO SÓLIDO FERMENTADO (B).

4.7.2 Determinação de Açúcares Redutores pelo Método de DNS

Para a determinação dos açúcares redutores dos hidrolisados utilizou-se o método que utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), originalmente proposto por Miller (1959). O método baseia-se na redução do DNS a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico (Figura 12). Após aquecimento, a solução torna-se avermelhada, sendo lida no espectrofotômetro a 540 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific - Waltham, Massachusetts, EUA).

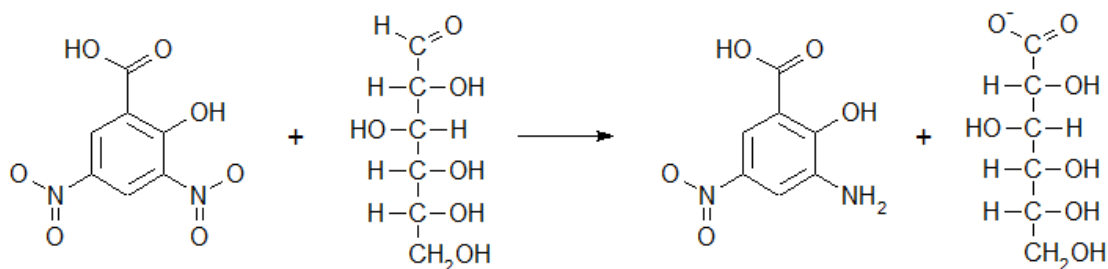


FIGURA 12 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO DNS (ÁCIDO 3,5 – DINITROSALICÍLICO)

4.7.3 Quantificação de Ácido D-galacturônico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação do ácido D-galacturônico foi realizada utilizando o sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC System, com amostrador automático, forno de aquecimento de coluna e detector para índice de refração. A análise foi realizada em coluna *Aminex* HPX-87H (*Bio-Rad, Hercules*, EUA) a 65 °C, precedida por pré-coluna catiônica *Cation-H* (*Bio-Rad*), eluição com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. A quantificação foi efetuada por padronização externa com ácido D-galacturônico. Os dados obtidos foram tratados pelo software Agilent OpenLAB Chromatography Data System (CDS).

4.7.4 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para a CCD, foram pesados 10 mg da amostra do hidrolisado liofilizada e ressuspensos em 1 mL de água ou metanol. As amostras foram aplicadas em placas de sílica-gel 60 G (Merck, Whitehouse Station – Lambertville, EUA), com 8 cm de altura total. As análises foram desenvolvidas com a composição de solvente: acetato de etila, propanol, ácido acético e água em proporção 4:2:2:1 (v/v), adequada para a separação de monossacarídeos. Após a corrida, a visualização dos carboidratos foi realizada com orcinol-ácido sulfúrico a 100 °C (SKIPSKI, 1975).

Os monossacarídeos ramnose, glucose, arabinose, ácido glucurônico, ácido D-galacturônico, galactose, manose e xilose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram utilizados como padrões.

4.7.5 Derivatização das Amostras para Análise em Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

A redução foi realizada com 2 mg de amostra hidrolisada solubilizada em 1 mL de água e 1 mg de NaBH₄. As amostras foram mantidas por um período de 2 h a 50 °C. Em seguida, a amostra reduzida foi lavada com metanol, que foi evaporado em rotaevaporador. Este processo foi repetido por 3 vezes para remoção do borohidreto residual. Adicionaram-se 750 µL de anidrido acético à amostra reduzida, sendo, em seguida, o meio reacional mantido à temperatura ambiente por 16 h. A reação foi parada com adição de gelo e os derivados acetilados foram extraídos em clorofórmio (CHCl₃). A fase orgânica foi filtrada em Na₂SO₄ anidro para remoção da água residual. O filtrado foi seco em rotaevaporador (WOLFROM e THOMPSON, 1963) e submetido à análise por CG-EM.

4.7.6 Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

Estas análises foram realizadas em CG-EM da marca Varian (Palo Alto, CA), modelo Saturn 2000R. A detecção por massas foi feita pela ionização eletrônica (70 eV) e analisador do tipo *ion trap*. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e do *trap* em 200 °C. Hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL min⁻¹. As análises foram realizadas em coluna DB-225-MS (Agilent J&W, Santa Clara, EUA), com programação de temperatura de 50 °C a 220 °C a 40 °C min⁻¹, mantida por 25 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA DE DOSAGEM DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO

Para selecionar os substratos sólidos e micro-organismos produtores de pectinases por FES, foram testados os substratos farelo de trigo, bagaço de laranja lavado e não lavado (70% m/m), misturados com bagaço de cana como agente de volume (30% m/m). A determinação da atividade pelo método de DNS (item 4.7.1) foi realizada utilizando o extrato bruto obtido das diferentes fermentações. Os resultados estão apresentados na Figura 13.

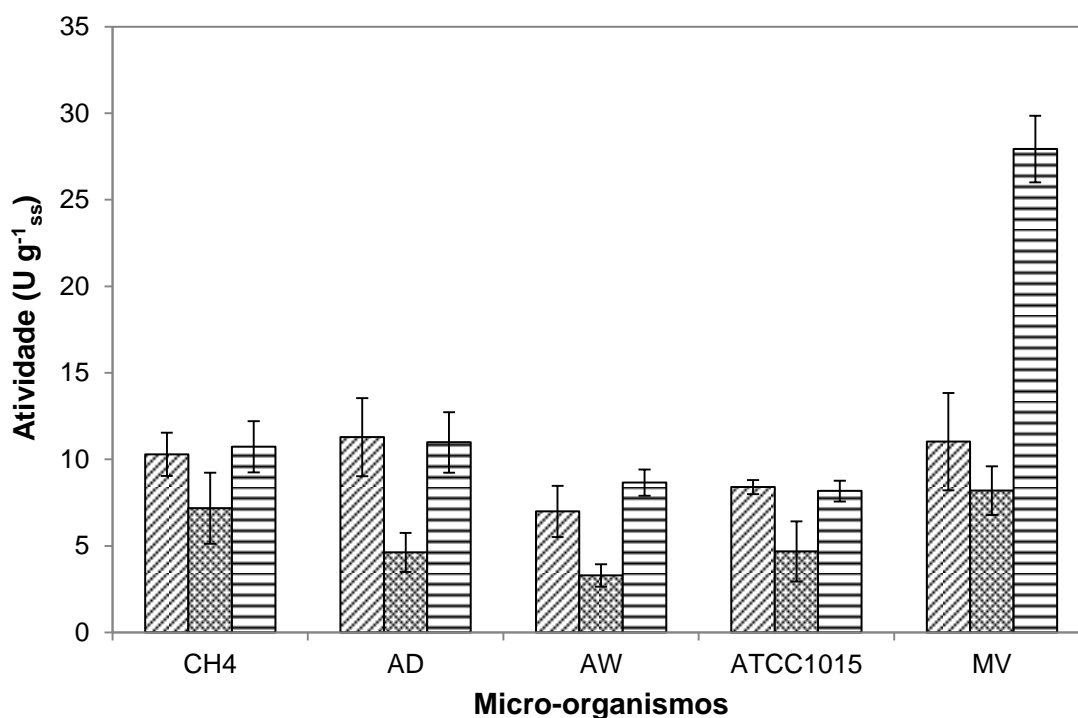


FIGURA 13 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR DIFERENTES CEPAS E EM DIFERENTES MEIOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.

▨ - meio 1: 30% bagaço de cana e 70% farelo de trigo; ▩ - meio 2: 30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja não lavado; ▨ - meio 3: 30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja lavado. CH4, ATCC 1015, AD E AW são cepas de *Aspergillus niger*; e MV é a cepa de *A. oryzae* isolada neste trabalho. Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C, 24 h de cultivo. Determinação de atividade realizada com o extrato bruto do sólido fermentado.

Os resultados mostraram que a cepa de *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 crescida no meio 3 (30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja lavado) apresentou a maior atividade enzimática ($28 \text{ U g}^{-1}_{\text{SS}}$). Por isso, ela foi selecionada para dar continuidade aos experimentos.

Pode-se também verificar (Figura 13) que o uso do bagaço de laranja não-lavado resultou em valores de atividades em torno de 65% menores do que aqueles obtidos com o bagaço de laranja lavado; ou seja, a lavagem do bagaço apresentou uma influência positiva bastante expressiva sobre a produção de pectinases, provavelmente pelo fato de substâncias inibidoras da produção de pectinases serem eliminadas do meio durante a lavagem. A presença de óleos essenciais da casca da laranja podem ter inibido o crescimento do fungo e a produção de pectinases, já que a adição de açúcares ao meio de cultivo, como a glucose e a sacarose, ao nível de até 10% (m V^{-1}), não reprime a expressão de pectinases em fermentação no estado sólido; pelo contrário, aumenta sua expressão em até três vezes (SOLIS-PEREYRA *et al.*, 1993; SOLIS-PEREYRA *et al.*, 1996). A cepa *A. niger* CH4 no meio de cultivo 1 (30% bagaço de cana e 70% farelo de trigo) foi utilizada como controle, para comparação dos resultados obtidos, uma vez que já vinha sendo estudada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise – LTEB como produtora de pectinases por FES (BIZ, 2012).

5.1.1 Cinética de Produção de Pectinases

Foi realizado um estudo de cinética de produção de pectinases utilizando as duas cepas de *Aspergillus* e meios selecionados anteriormente, a fim de se determinar o tempo necessário para se obter a maior produção de enzimas nas condições propostas. Determinou-se a atividade pectinolítica do extrato bruto obtido após os diferentes tempos de fermentação.

Os resultados (Figura 14) mostraram que o pico máximo de produção de pectinases ocorreu em 24 h de cultivo para *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 ($16 \text{ U g}^{-1}_{\text{SS}}$) e em 18 h para *A. niger* CH4 ($7 \text{ U g}^{-1}_{\text{SS}}$). Porém, pode-se verificar também que a atividade de pectinases produzidas nas duas condições selecionadas apresentou-se em torno de 40% menor quando comparada aos resultados

anteriores (Figura 13) ($28 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$ e $11 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$, para *A. oryzae* e *A. niger*, respectivamente). Os cultivos foram então repetidos com bagaço de cana utilizado anteriormente (Figura 13), para se determinar se a redução da atividade era devida ao novo lote de bagaço de cana utilizado nos experimentos da Figura 14. Após 24 h de incubação, a atividade máxima encontrada foi de em torno de $30 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$, mostrando que o lote de bagaço de cana tinha influência na atividade máxima encontrada nos cultivos.

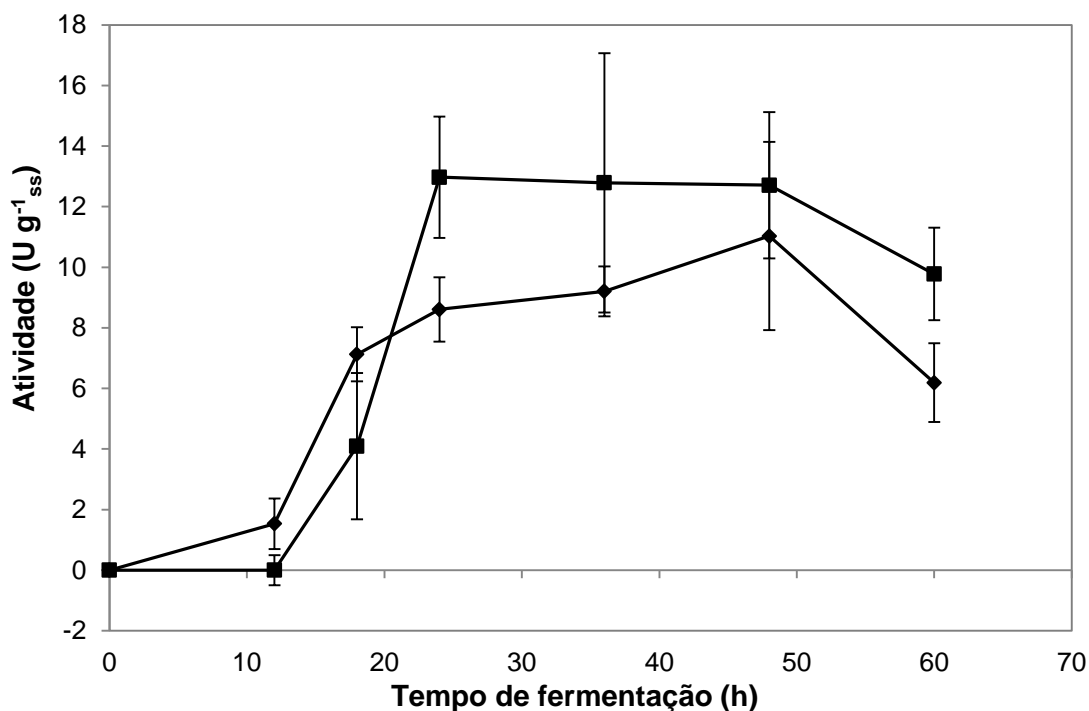


FIGURA 14 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Aspergillus niger* CH4 (◆) E *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 (■) EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO. Substratos: 30% bagaço de cana e 70% farelo de trigo para *Aspergillus niger* CH4; e 30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja para *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C. Dosagem de atividade de pectinases feita no extrato bruto.

Como a cepa de *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 era a de maior interesse neste trabalho, já que apresentou uma maior atividade, foi fixado o tempo de cultivo de 24 h para os próximos ensaios. Estes resultados coincidem com os já encontrados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise - LTEB. Baron (2010) conseguiu os melhores resultados em 24 h de cultivo, alcançando uma atividade de $16 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$ em um meio contendo 90% de bagaço de laranja não lavado e 10% de bagaço de cana, para *A. niger* CH4.

5.1.2 Desenvolvimento de Metodologia de Dosagem de Atividade Diretamente no Sólido Fermentado

O objetivo principal deste trabalho foi realizar a hidrólise enzimática da pectina para a produção de ácido D-galacturônico. Considerando este objetivo e levando em conta que a eficiência de extração das pectinases do sólido fermentado pode não ser de 100% e que, tanto para a dosagem de atividade quanto para o processo de hidrólise da pectina para produção do ácido D-galacturônico, é desejável a economia de uma etapa, foi estudada a aplicação direta do sólido no meio reacional de dosagem de atividade.

Não há na literatura relatos sobre um método para determinação da atividade de pectinases diretamente em sólido fermentado. Portanto, foi otimizado um método que utiliza diretamente o sólido, em vez do extrato bruto, para aplicação na etapa posterior do trabalho. Partiu-se da ideia de aplicação direta do sólido em processos de hidrólise, já desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise - LTEB, na modificação de lipídeos (RASERA et al., 2012) e na síntese de ésteres etílicos (SALUM et al, 2010; FERNANDES et al, 2007) com adaptações para medição da atividade pectinolítica, pelo método que dosa os açúcares redutores resultantes da hidrólise da pectina por DNS (item 4.7.1).

Observou-se (Figura 15) que, para todas as preparações enzimáticas, as atividades obtidas foram maiores para *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, tendo-se atingido um máximo de $52 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$ quando o sólido fermentado seco foi adicionado diretamente ao meio reacional contendo pectina. A atividade obtida para o sólido fermentado liofilizado de *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 foi cerca de 90% maior do que as atividades obtidas para os extratos. Para *A. niger* CH4, obteve-se 86% de aumento de atividade em relação ao extrato bruto do sólido fermentado. A liofilização do sólido fermentado não afetou significativamente a atividade, visto que não houve diferença significativa entre as atividades encontradas para o extrato bruto obtido do sólido úmido e o extrato obtido do sólido liofilizado.

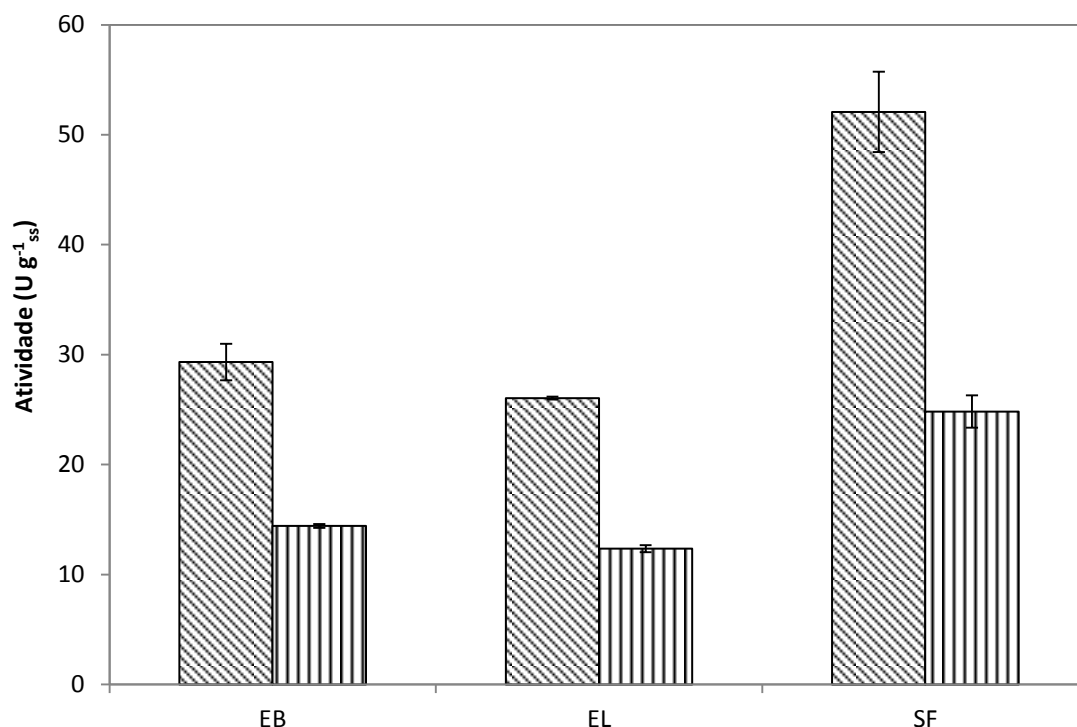


FIGURA 15 – COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES OBTIDAS COM DIFERENTES PREPARAÇÕES DE PECTINASES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO POR CEPAS DO GÊNERO *Aspergillus*.

Sólidos fermentados produzidos por *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 - ▨ ; e por *A. niger* CH4 - ▤ . EB: extrato bruto do sólido fermentado úmido; EL: extrato obtido do sólido fermentado após liofilização; SF: sólido fermentado liofilizado.

5.1.2.1 Efeito do Tampão na Atividade Enzimática do Sólido Fermentado

A fim de se verificar o efeito do tampão na atividade, a hidrólise da pectina utilizando o sólido fermentado foi realizada com tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ em pH 4,5, água e água com pH ajustado para 4,5 com ácido acético. Os resultados foram comparados com a atividade do extrato bruto do sólido liofilizado (item 4.2.6.1), e estão apresentados na Figura 16. Pode-se verificar que a atividade do sólido fermentado liofilizado, quando se utilizou tampão acetato, apresentou-se maior do que quando se utilizou água ou água com pH ajustado no meio reacional, e é mais que o dobro da atividade do extrato do sólido liofilizado (59 U g⁻¹ ss e 22 U g⁻¹ ss, respectivamente). Para a cepa *A. niger* CH4, não se pode verificar diferença significativa entre os resultados com tampão, água ou água com pH ajustado. Portanto, devido aos bons resultados obtidos para *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, decidiu-se dar continuidade ao projeto utilizando o

tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,5 no método de dosagem de atividade de pectinases no sólido fermentado seco.

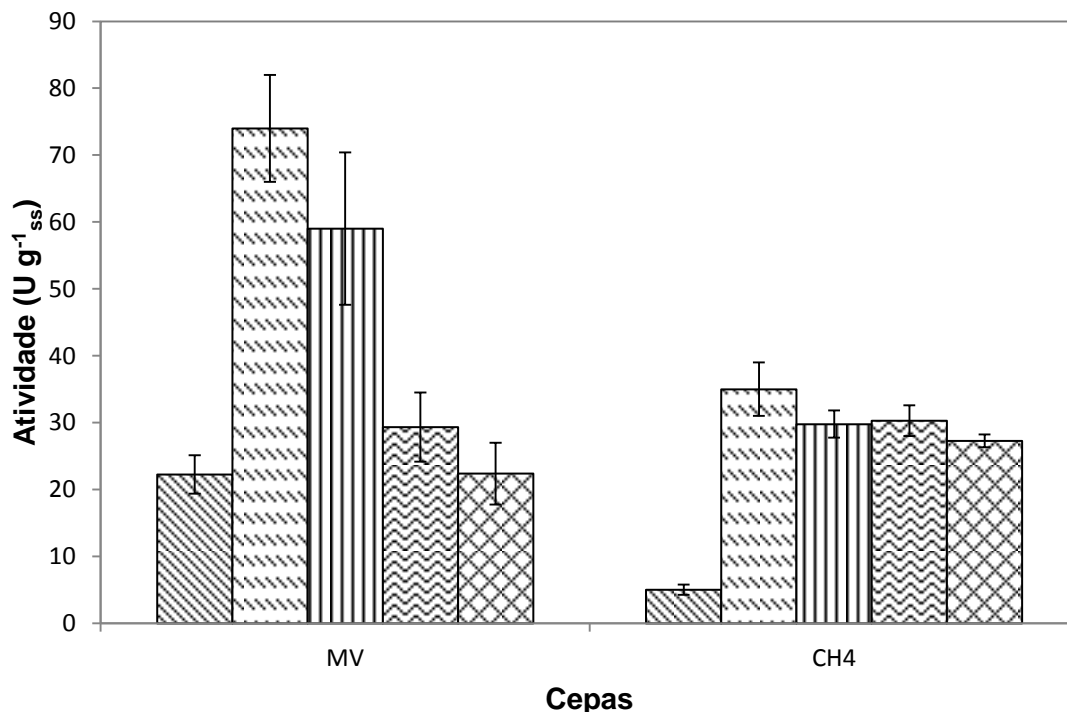


FIGURA 16 - EFEITO DO pH DA SOLUÇÃO DO MEIO REACIONAL NA ATIVIDADE DE PECTINASES DO SÓLIDO FERMENTADO.

▨- extrato do sólido liofilizado, ▤- sólido fermentado úmido, ▩- com tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, ▥- com água, ▦- com água em pH 4,5. MV: *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01; CH4: *A. niger* CH4. Sólido fermentado liofilizado produzido utilizando os substratos: 30% bagaço de cana e 70% farelo de trigo para *A. niger* CH4; e 30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja lavado para *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C, 24 h. Dosagem de atividade de pectinases feita no sólido fermentado.

Diante deste conjunto de resultados pode-se confirmar que, de fato, a atividade no sólido fermentado é maior do que no extrato bruto obtido do meio fermentado. Isso pode ser devido à menor eficiência da extração do complexo enzimático do sólido fermentado.

Em todos os resultados obtidos até aqui, a cepa de *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 se mostrou uma boa produtora de pectinases, apresentando valores de atividade pectinolítica maiores do que a produzida por *A. niger* CH4. Portanto, os resultados seguintes foram obtidos utilizando somente o sólido fermentado com a cepa *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, no meio contendo bagaço de laranja lavado (70%) e bagaço de cana (30%).

5.1.2.2 Influência da Trituração do Sólido

O sólido fermentado, por conter bagaço de cana e cascas de laranja, apresentava-se heterogêneo após os cultivos e secagem (Figura 17). Devido a isto, verificou-se a influência da trituração do sólido seco em liquidificador antes da determinação de atividade, em diferentes tempos. A atividade foi determinada nas amostras moídas por adição direta do sólido ao meio reacional.



FIGURA 17 – ASPECTO DO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Substratos: Bagaço de cana (30%) e bagaço de laranja lavado (70%). Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C, 24 h.

Observou-se (Figura 18) que o tempo de trituração das amostras não teve um efeito significativo na atividade pelo teste T de Student, com nível de confiança 95%, para as amostras de sólido fermentado com *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Além disso, não se pode verificar uma diminuição no valor do erro padrão (barras de erros) com a homogeneização do sólido. Portanto, o sólido utilizado nos experimentos seguintes não foi triturado, considerando que em uma indústria, ou biorrefinaria, isto economizaria custos, energia e tempo do processo.

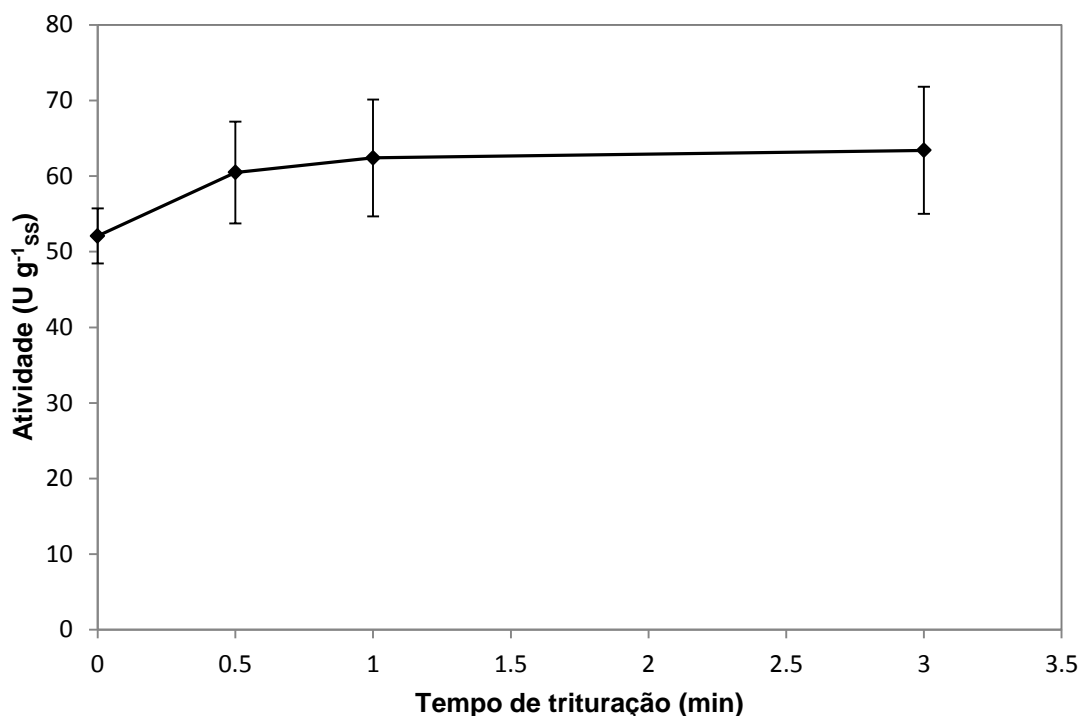


FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DA TRITURAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO COM *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 EM SUA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA.

Sólido fermentado liofilizado produzido utilizando os substratos: 30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja lavado. Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C, 24 h.

5.1.2.3 Efeito da Concentração de Pectina, da Temperatura e do Tempo de Hidrólise na Atividade do Sólido Fermentado

Mesmo com a seleção de micro-organismo, meio de cultura e método de dosagem de pectinases, conforme descrito anteriormente, os valores de atividade obtidos com o sólido fermentado ainda eram menores que alguns reportados na literatura (Tabela 4, página 40). Como os métodos relatados nos diferentes trabalhos variam bastante em termos de condições de dosagem, tornando difícil a comparação dos resultados, decidiu-se prosseguir os estudos no sentido de otimizar o método de dosagem de atividade do sólido fermentado com *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, variando a temperatura de hidrólise, concentração de pectina, massa de sólido fermentado e o pH do meio. Os resultados obtidos na otimização estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PECTINA, DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE HIDRÓLISE NA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

		Atividade no sólido fermentado ($U\ g^{-1}_{ss}$)		
		Pectina (% $m\ V^{-1}$)		
T ($^{\circ}C$)	t (min)	0,5	1,0	2,0
35	5	132,8 \pm 17,6	91,0 \pm 30,1	202,1 \pm 30,6
	10	88,0 \pm 8,8	95,4 \pm 1,6	121,6 \pm 17,9
	15	55,4 \pm 5,0	79,6 \pm 30,3	111,5 \pm 9,0
45	5	157,7 \pm 19,7	222,2 \pm 17,6	241,0 \pm 13,0
	10	110,9 \pm 10,1	137,3 \pm 10,6	140,1 \pm 15,0
	15	96,0 \pm 8,5	129,1 \pm 4,8	156,6 \pm 17,1
50	5	147,4 \pm 13,5	288,9 \pm 13,0	420,7 \pm 25,4
	10	109,3 \pm 6,7	149,6 \pm 22,3	105,1 \pm 4,9
	15	73,5 \pm 9,2	114,1 \pm 23,0	158,4 \pm 23,9
55	5	116,3 \pm 0,5	240,6 \pm 6,2	370,0 \pm 44,1
	10	105,6 \pm 8,3	162,1 \pm 8,8	218,4 \pm 13,7
	15	61,9 \pm 4,8	131,7 \pm 5,7	202,1 \pm 3,6
65	5	135,0 \pm 17,6	261,9 \pm 5,2	217,5 \pm 27,5
	10	89,1 \pm 19,2	114,8 \pm 2,6	137,0 \pm 2,9
	15	71,9 \pm 4,8	65,9 \pm 11,6	72,9 \pm 7,3

A Tabela 5 mostra que os melhores resultados de atividade são obtidos a 50 $^{\circ}C$, com incubação por 5 min e com 2% ($m\ V^{-1}$) de pectina no meio reacional (420,7 $U\ g^{-1}_{ss}$). Porém, nessa concentração, há formação de precipitado de pectina na solução, o que interfere na leitura em espectrofotômetro, sendo necessária a sua centrifugação e retirada de uma alíquota de amostra do sobrenadante, para que o precipitado não interfira na leitura. Portanto, visando simplificar o método, foi selecionada a condição que utiliza a solução de pectina 1%, a 50 $^{\circ}C$ com incubação por 5 min, como condição padrão para determinação de atividade enzimática no sólido fermentado.

Os resultados mostrados na Tabela 5 também refletem as propriedades cinéticas das pectinases contidas no sólido fermentado, sendo possível concluir que as enzimas produzidas por *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 apresentam temperatura ótima de 50 $^{\circ}C$ e que mesmo a 65 $^{\circ}C$ apresentaram uma boa atividade (217,5 $U\ g^{-1}_{ss}$). Estas condições podem ser úteis no processo de hidrólise para produção do ácido D-galacturônico. Entretanto, a Tabela 5 mostra

apenas a atividade enzimática, que é determinada a partir da velocidade inicial da reação, nos primeiros 5 min. Em caso da hidrólise total da pectina para produção do ácido D-galacturônico, tempos maiores de incubação são necessários. Portanto, estudos com maiores tempos e em diferentes temperaturas foram realizados e estão apresentados mais adiante (item 5.1.1).

Foram avaliados também os efeitos da massa de sólido fermentado adicionado e o pH do meio reacional na atividade do sólido fermentado (Tabela 6). Os melhores valores de atividade (média de 263 U g⁻¹_{ss}) foram obtidos utilizando 20 mg de sólido fermentado a pH 4,0 e a pH 4,5. Como não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nesta faixa de pH e o valor de pH 4,5 já estava sendo utilizado neste trabalho, os experimentos seguintes foram realizados com o tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ a pH 4,5.

TABELA 6 - EFEITO DA MASSA DE SÓLIDO E DO pH NO MEIO SOBRE A ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO COM *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01

Massa de sólido fermentado (mg)	pH	Atividade pectinolítica (U g ⁻¹ _{ss})
20	4,0	266,0 ± 11,0
20	4,5	260,0 ± 7,4
20	5,0	113,3 ± 8,8
40	4,5	151,5 ± 9,8
60	4,5	141,3 ± 19,4

Condição de hidrólise: Solução de pectina 1,0%, 50 °C e tempo de incubação 5 min.

Avaliando-se os resultados obtidos na otimização do procedimento de dosagem de atividade pectinolítica diretamente no sólido fermentado liofilizado, pode-se considerar que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizaram de 20 mg de sólido fermentado, em meio com pH 4,5 ajustado com tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, com uma solução de pectina de 1,0% (m V⁻¹) e incubação a 50 °C por 5 min. Estas condições foram utilizadas em todas as determinações de atividade a partir daqui.

Antes da otimização do método, os resultados de atividade pectinolítica eram até 20 vezes menores do que os resultados encontrados na literatura (Tabela 4, página 40); porém com a otimização, resultados aceitáveis foram

obtidos, e a diferença em relação ao maior valor encontrado diminuiu, chegando a uma diferença de 4 vezes. Além disso, obteve-se um aumento nos valores de atividade em cerca de 10 vezes, comparando-se os valores obtidos no início do trabalho ($27 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$) com o uso do extrato bruto, e após a otimização do método utilizando o sólido fermentado liofilizado (em torno de $270 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01

O sólido fermentado utilizado nestes experimentos foi produzido com os substratos bagaço de cana e bagaço de laranja lavado, com incubação a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a máxima produção da enzima (24 h) o sólido fermentado foi seco em liofilizador por 24 h e armazenado em sacos plásticos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Este sólido apresentou uma atividade inicial média de $260 \text{ U g}^{-1}_{\text{ss}}$.

5.2.1 Estabilidade do Sólido Fermentado à Temperatura

Estudos anteriores (Tabela 5, página 67) de otimização da metodologia de dosagem mostraram que a temperatura ótima para a utilização do sólido fermentado com biocatalisador na hidrólise da pectina é de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Porém, estes estudos foram realizados com apenas 5 min de incubação e a enzima pode não ser estável em tempos de incubação maiores, requeridos para os estudos de hidrólise enzimática da pectina para produção do ácido D-galacturônico. Para determinar a melhor temperatura a ser utilizada no processo de hidrólise, foram testadas 4 temperaturas diferentes (de 30 a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$), com tempos de incubação de até 27 h (Figura 19). Pode-se verificar que, quando o sólido foi incubado a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura ótima para a atividade determinada anteriormente, as pectinases mantêm 100% de atividade após incubação por 1 h, mas perdem totalmente a atividade após 5 h de incubação. Portanto, o processo de hidrólise para produção de ácido D-galacturônico, que pode requerer tempos maiores que 24 h para a máxima conversão, deve ser realizado a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura na qual se observa

178% de atividade residual após 24 h de incubação. Este aumento na atividade se deve, provavelmente, à extração da enzima após certo tempo de incubação.

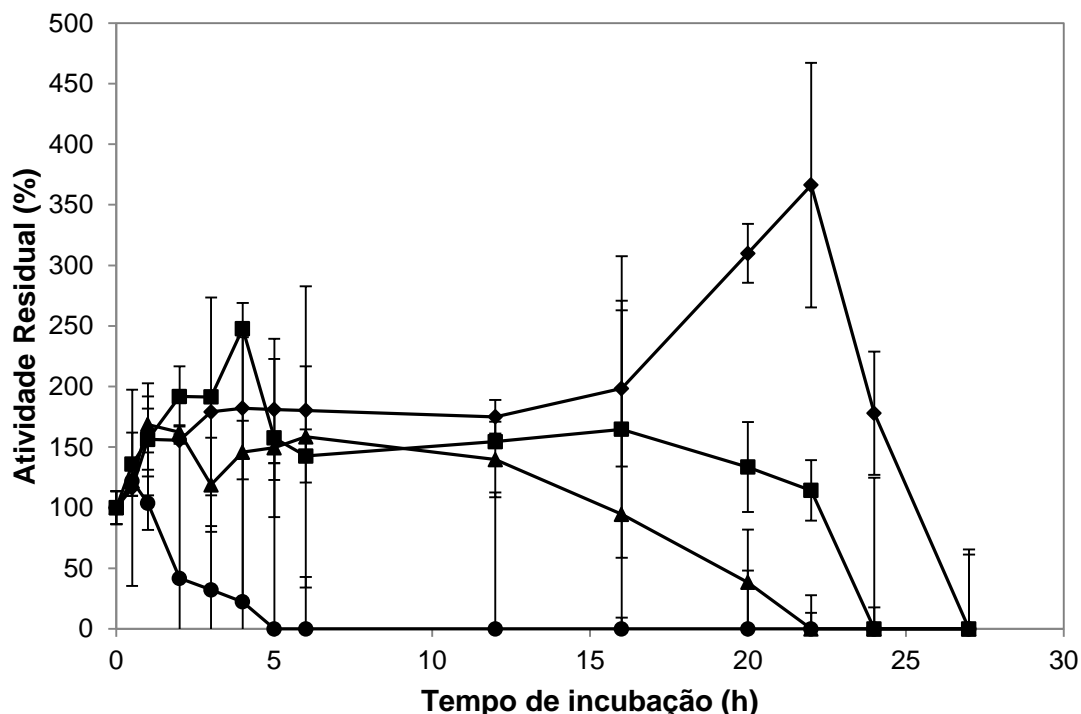


FIGURA 19 – ATIVIDADE RESIDUAL DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 FRENTE A DIVERSAS TEMPERATURAS E TEMPOS DE INCUBAÇÃO.

♦ - 30 °C, ■ – 35 °C, ▲ – 40 °C, e ● - 50°C. Dosagem de atividade de pectinases feita pelo método de adição direta do sólido fermentado ao meio reacional. Condição: 20 mg de sólido fermentado com *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 e solução de pectina 1,0%, e tampão acetato a pH 4,5.

5.2.2 Efeito do Tipo de Secagem

Para verificar a influência do tipo e tempo de secagem do sólido fermentado na atividade enzimática, foram avaliadas duas formas de secagem: a liofilização e a circulação de ar seco em colunas. As respostas dos dois métodos de secagem foram comparadas à atividade do sólido úmido, logo após a fermentação. Verificou-se uma perda de 25% da atividade após 24 h de secagem em liofilizador e 42% após 2 h de secagem em circulação de ar (Tabela 7). A circulação de ar apresentou uma secagem mais rápida do que a liofilização, porém a liofilização apresentou uma menor perda de atividade pectinolítica;

portanto, empregou-se este método para a secagem do sólido neste trabalho. Apesar dos valores de atividade obtidos após a liofilização em diferentes tempos, não apresentarem diferenças significativas, o tempo de 24 h foi escolhido, pois outros experimentos já haviam sido realizados nestas condições. É importante ressaltar que, em uma escala de processo maior, a secagem do sólido fermentado em coluna circulação de ar pode ser uma boa alternativa, já que é um sistema simples, barato e rápido.

TABELA 7 - INFLUÊNCIA DO MÉTODO E TEMPO DE SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 EM SUA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

Sólido	Umidade (%)	Atividade relativa (%)
Úmido	54,4	100,0 ± 0,3
Corrente de ar (1 h)	19,7	72,5 ± 1,3
Corrente de ar (2 h)	4,1	58,3 ± 4,7
Liofilizador (18 h)	3,8	80,6 ± 5,1
Liofilizador (21 h)	3,8	78,0 ± 5,5
Liofilizador (24 h)	3,7	72,0 ± 9,4

Condições: 5 g de sólido fermentado seco em liofilizador ou por corrente de ar seco em coluna. Dosagem de atividade: método de adição direta do sólido fermentado ao meio reacional com 1,0% de pectina a 50 °C. Valores dados em atividade relativa (%) à atividade do sólido úmido

5.2.3 Estabilidade ao Armazenamento

O sólido fermentado liofilizado por 24 h foi avaliado quanto à sua estabilidade ao armazenamento a 4 °C. O sólido manteve 100% de sua atividade residual após 28 dias de armazenamento, e mesmo após 120 dias, houve uma perda de apenas 26% de atividade (Figura 20).

Um fator que pode ter influência na manutenção da atividade da enzima armazenada é a sua baixa atividade de água, pois a presença de água no material pode levar ao crescimento microbiano e à desnaturação da enzima (RÜKOLD, GROBECKER e ISENGARD, 2001). Estes resultados são importantes

do ponto de vista de desenvolvimento de processo industrial aplicando-se o sólido fermentado para a produção do ácido D-galacturônico.

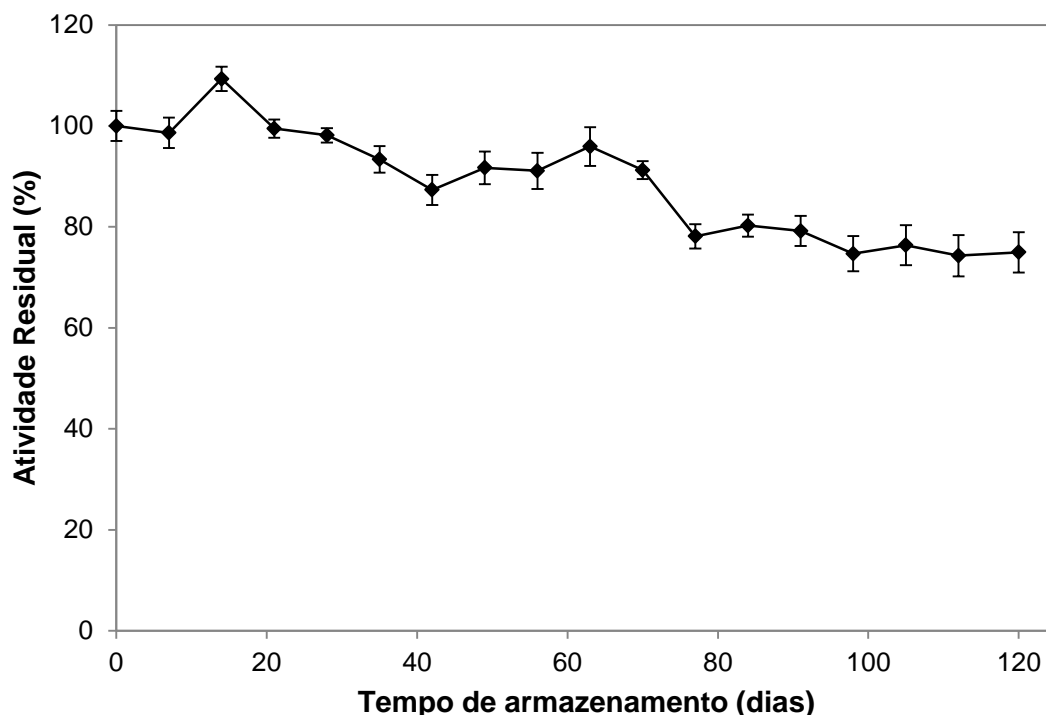


FIGURA 20 – ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Sólido fermentado liofilizado armazenado a 4 °C. Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C, 24 h. Dosagem de atividade de pectinases feita pelo método de adição direta do sólido fermentado liofilizado ao meio reacional.

5.2.4 Estabilidade ao pH

As pectinases presentes no sólido fermentado com *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, após serem incubadas em tampões com diferentes valores de pH por 1 h a 30 °C, apresentaram uma maior atividade em pH 4,5 (Figura 21), com atividade residual de 170%. Novamente, este aumento na atividade das enzimas pode ser explicado pelo fato de haver uma extração de enzimas do sólido que estariam inicialmente indisponíveis para atuar na hidrólise da pectina. Nos valores de pH 4,0 e 5,0, as enzimas ainda apresentaram em torno de 130% da atividade, porém, em valores de pH 3,0 e 6,0, não apresentaram mais atividade. Portanto, pode-se concluir que a faixa de pH ótimo para as pectinases é entre 4,0 a 5,0, sendo o melhor resultado obtido em pH 4,5, utilizando o tampão acetato 0,2 mol L⁻¹.

Os resultados relatados na literatura com relação ao efeito do pH na estabilidade de pectinases indicam que o pH ótimo para a sua estabilidade está entre 4,0 e 5,0. Nos dados reportados por Patil e Dayanand (2006), o pH ótimo para a produção de pectinases é 5,0. Este valor pode refletir no valor de pH ótimo das pectinases em reações de hidrólise. Na hidrólise das cascas de toranja, Wilkins, Widmer e Grohmann (2007), verificaram que o melhor pH para a obtenção de ácido D-galacturônico está entre 3,8 e 4,8. Acuña-Argüelles e colaboradores (1995) verificaram que pectinases produzidas por FES podem ser estáveis em uma faixa de pH entre 2,5 e 8,0. Estes diferentes resultados podem ser atribuídos a alguns fatores, como a origem das pectinases ou às isoformas de enzimas produzidas por um mesmo micro-organismo (LÓPEZ et al., 2004). Estas variações também dependem, em grande parte, das condições do ensaio, como o tempo de incubação, temperatura, método e substrato utilizado para a medida de atividade.

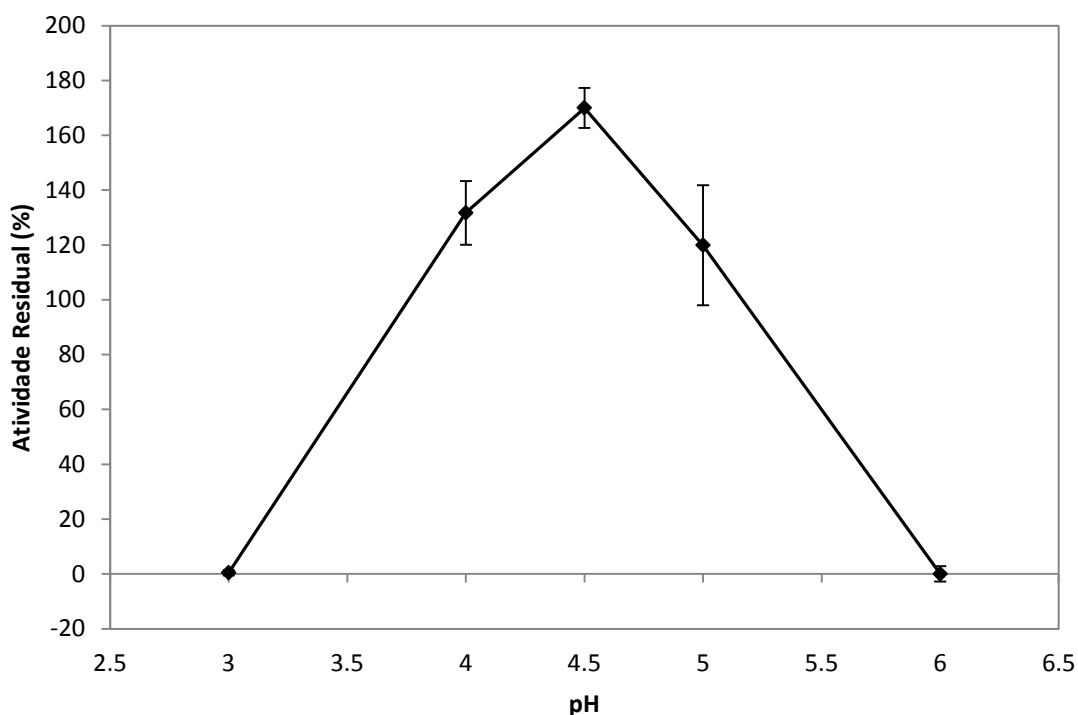


FIGURA 21 - ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 FRENTE AO pH DO MEIO.

Sólido fermentado liofilizado produzido utilizando 70% bagaço de laranja lavado e 30% bagaço de cana. Condições de cultivo: umidade 70%, 30 °C, 24 h. O sólido foi incubado por 1 h em tampão acetato com diferentes valores de pH; após a incubação, o pH foi ajustado para 4,5 e foi feita a dosagem de atividade de pectinases por adição direta do sólido fermentado ao meio reacional contendo pectina.

5.2.5 Estudo da Inibição das Pectinases pelo Ácido D-galacturônico

A determinação da inibição de pectinases pelo principal produto de hidrólise, o ácido D-galacturônico, é um dado muito importante para o processo industrial de hidrólise da pectina, uma vez que pode ser necessária a remoção do produto do meio para se obter maiores rendimentos. Segundo a literatura, poligalacturonases comerciais de *A. niger* sofrem inibição competitiva em presença de ácido D-galacturônico a partir de 1 g L^{-1} do produto no meio reacional. Para resolver este problema, é recomendando o uso de biorreatores de membranas, nos quais o produto é removido do meio reacional durante a reação (BÉLAFI-BAKÓ et al., 2007; KISS et al., 2009).

Portanto, foram realizados experimentos de hidrólise da pectina para verificar se há inibição das pectinases utilizando o sólido fermentado, nos quais foram adicionadas diferentes concentrações do ácido ($0, 3 \text{ e } 6 \text{ g L}^{-1}$) no início da reação.

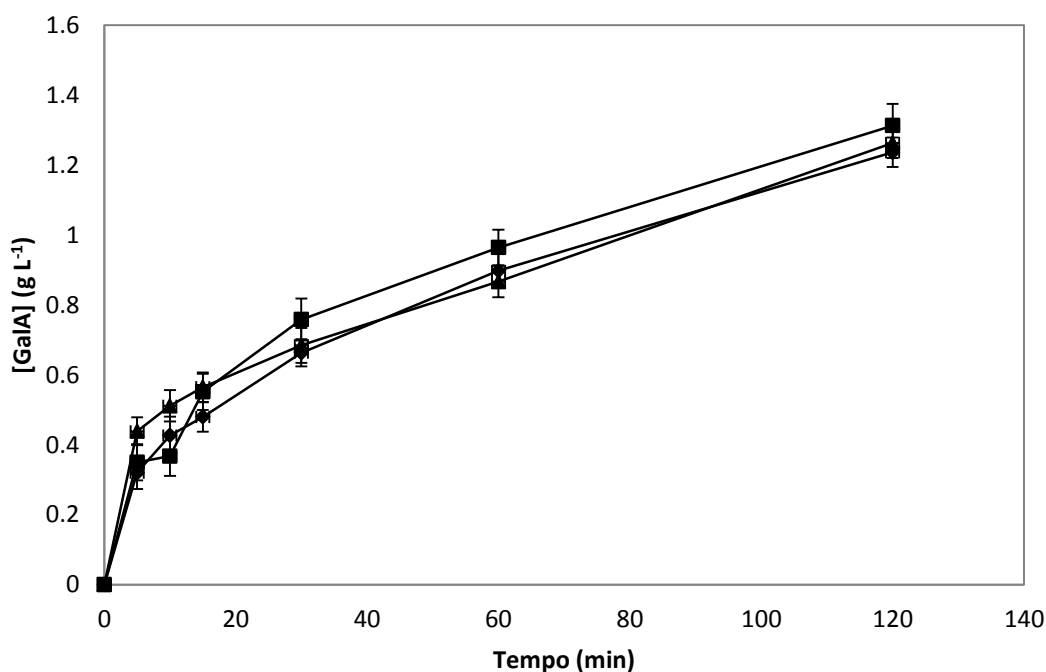


FIGURA 22 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO AO MEIO REACIONAL NA ATIVIDADE DE PECTINASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Adição de ácido D-galacturônico de \diamond - 0 g L^{-1} , \blacksquare - 3 g L^{-1} , e \blacktriangle - 6 g L^{-1} ao meio de hidrólise da pectina. Condições de hidrólise: 2 g de sólido fermentado com *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01, pectina 2% (m V^{-1}), pH 4,5, 50 mL, 180 rpm, a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Análise do ácido D-galacturônico feita por CLAE.

O teor de ácido D-galacturônico no meio reacional foi quantificado por CLAE, descontando-se o ácido adicionado no início da reação. Pode-se verificar (Figura 22) que não houve influência do ácido D-galacturônico adicionado ao meio na atividade das pectinases presentes no meio reacional, indicando que não há inibição pelo produto e que, portanto, não é necessário retirar o produto do meio para se obter maiores rendimentos de reação quando se utiliza o sólido fermentado no processo de hidrólise da pectina.

5.3 HIDRÓLISE DA PECTINA CÍTRICA PARA PRODUÇÃO DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

5.3.1 Estudos Preliminares

Os ensaios prévios de produção de ácido D-galacturônico, utilizando o sólido fermentado contendo pectinases como catalisador, foram realizados a 30 °C e a 50 °C com 2% (m V⁻¹) de pectina e pH 4,5, acompanhando-se a reação por 72 h. A quantificação do ácido foi realizada em CLAE.

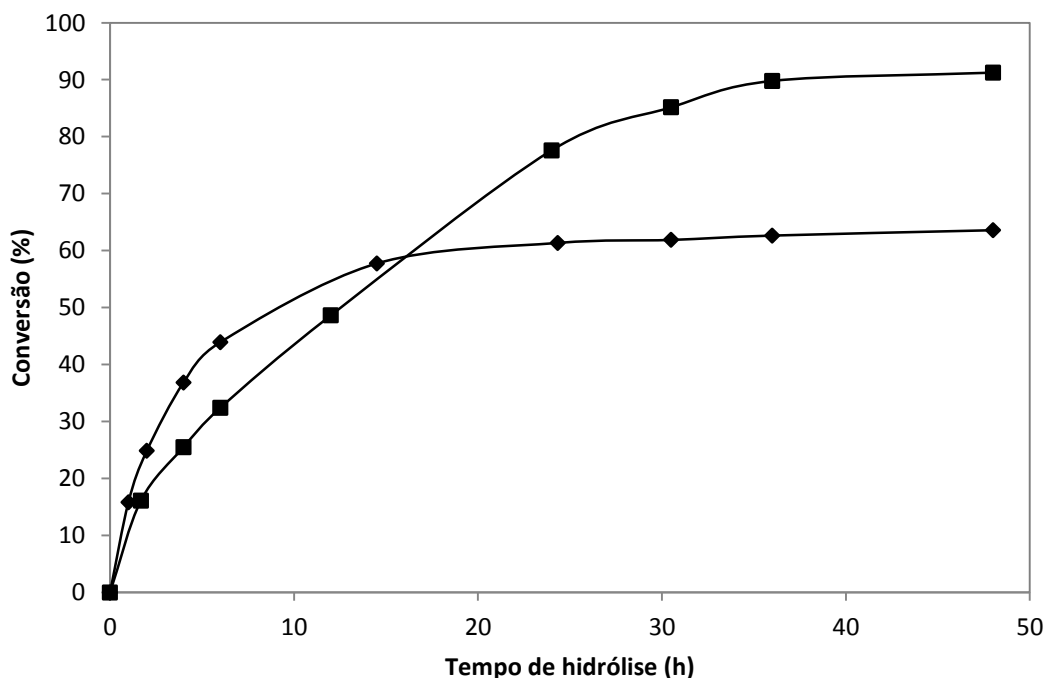


FIGURA 23 – CINÉTICA DE CONVERSÃO DE PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

Reação realizada utilizando 2 g de sólido fermentado liofilizado e 50 mL de pectina 2%, em agitador orbital a 180 rpm, com volume reacional de 50 mL, a (♦) 50 °C, e (■) 30 °C. Análise do ácido D-galacturônico feita por CLAE.

Verificou-se (Figura 23) que, a 30 °C, a conversão máxima de ácido D-galacturônico foi de cerca de 92% enquanto a 50 °C a conversão não passou de 60%. Este resultado pode ser explicado pela desnaturação da enzima, corroborando os resultados de estabilidade da atividade mostrados na Figura 19 (pág 65).

A maior estabilidade encontrada no meio reacional de hidrólise pode ser devida à presença do substrato, que protege o sítio ativo das enzimas. Os resultados obtidos no item 5.2.1 mostraram que a enzima se manteve ativa somente por 24 h a 30 °C e por 5 h a 50 °C, quando o sólido fermentado foi incubado em tampão sem a presença do substrato.

5.3.2 Otimização da Hidrólise da Pectina utilizando Delineamento Fatorial 2^3

Como o objetivo deste trabalho é a produção de ácido D-galacturônico pela hidrólise enzimática da pectina, trabalhar com maiores concentrações de pectina é de grande interesse. Para tanto, realizou-se um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, variando-se a temperatura (T), concentração de pectina (P) e quantidade de enzima (S). Os níveis adotados para cada variável foram: T = 25, 30 e 35 °C; P = 2, 6 e 10% (m V⁻¹); S = 2, 4 e 6 g. Como variável-resposta foi avaliado o teor de ácido D-galacturônico liberado (por CLAE), e a conversão da pectina em produto. Todas as reações foram realizadas com incubação por 72 h, para garantir o máximo de conversão da pectina. A Tabela 8 apresenta os resultados experimentais do delineamento fatorial, bem como as variáveis e níveis estudados.

TABELA 8 – DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 APLICADO NO ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
S - Massa de sólido (g)	2	4	6
P - [Pectina] (% m V ⁻¹)	2	6	10
T- Temperatura (°C)	25	30	35

Ensaio	S	P	T	^a Ácido D-	^b Conversão (%)
				galacturônico (g L ⁻¹)	
1	-1	-1	-1	15	101
2	+1	-1	-1	16	104
3	-1	+1	-1	34	45
4	+1	+1	-1	51	68
5	-1	-1	+1	16	109
6	+1	-1	+1	18	120
7	-1	+1	+1	46	61
8	+1	+1	+1	47	63
9	0	0	0	43	96
10	0	0	0	42	94
11	0	0	0	41	90

A atividade pectinolítica presente no sólido foi de 230 U g⁻¹_{SS}.

^a Teor de ácido D-galacturônico liberado após 72 h de hidrólise.

^b Conversão em ácido D-galacturônico a partir da pectina em 72h.

A Tabela 9 apresenta os efeitos das variáveis, calculados a partir dos dados experimentais da Tabela 8. Os efeitos significativos estão destacados com um asterisco.

TABELA 9 - VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE AS VARIÁVEIS-RESPOSTA DA HIDRÓLISE CATALISADA POR PECTINASES DE *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

Variáveis	^a Efeito	^b Efeito
	Teor de GalA	Conversão
S	5,3*	10,0*
P	28,1*	-49,5*
T	3,0	8,7*
S x P	4,2*	2,8
S x T	-3,7	-3,4
P x T	1,2	-3,2

a = Teor de ácido D-galacturônico liberado durante a hidrólise da pectina (g L^{-1})

b = Conversão da pectina em ácido D-galacturônico (% m/m)

* = efeitos significativos a 5%

S = Massa de sólido fermentado, P = Concentração de substrato, T = Temperatura

5.3.3 Variável-resposta: Teor de Ácido D-galacturônico (g L^{-1})

Em primeira análise (Tabela 9), quanto ao teor de ácido D-galacturônico liberado, é possível observar que apenas duas variáveis (massa de sólido fermentado e teor de pectina) avaliadas isoladamente apresentam efeitos significativos ao nível de 5% ($p \leq 0,05$). O efeito individual mais significativo (28,1) foi o teor de pectina (P). Quando se aumenta o teor de pectina no meio de 2% (m V^{-1}) para 10% (m V^{-1}) há um aumento de 28,1 unidades na liberação de ácido D-galacturônico, já que há mais substrato disponível para a produção do produto de interesse. Já a massa de sólido fermentado, ou seja, a quantidade de enzimas no meio, apresentou um efeito positivo, o que indica que quanto mais enzima no meio, maior será a liberação de ácido D-galacturônico. Porém, este efeito foi menos significativo (5,3). Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas os parâmetros lineares, valores elevados destes são recomendados, dando atenção principalmente ao teor de pectina no meio. Por ora, não se observou nenhuma inibição pelo produto. Portanto, maiores teores de pectina no meio podem ser avaliados.

Analisando-se os efeitos secundários (Tabela 9), ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, pode-se verificar que somente a interação sinérgica entre teor de pectina (P) e massa do sólido fermentado (S) apresentou um efeito significativo e positivo, ou seja, há um aumento de 4,2 unidades percentuais quando se passa simultaneamente os dois parâmetros do nível (-1) para o nível (+1).

A análise de variância (ANOVA, Tabela 10) indicou que, para a variável-resposta teor de ácido D-galacturônico, o modelo polinomial não é estatisticamente significativo já que a falta de ajuste foi significativa ao nível de confiança de 95% ($p=0,0087$). Assim, o modelo não pode ser utilizado para explicar a variância obtida neste experimento.

TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EQUAÇÃO PREVISTA PARA O TEOR DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO LIBERADO NA HIDRÓLISE DA PECTINA CÍTRICA, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 COMO BIOCATALISADOR

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p
S	56,981	1	56,981	38,854	0,0247*
P	1580,284	1	1580,284	1077,575	0,0009**
T	18,353	1	18,353	12,515	0,0714
SxP	36,187	1	36,187	24,675	0,0382*
SxT	26,979	1	26,979	18,397	0,0502
TxP	2,970	1	2,970	2,025	0,2906
Falta de Ajuste	330,606	2	165,303	112,718	0,0087**
Erro Puro	2,933	2	1,467		
Total SS	2055,291	10			R ² = 0,84

* = significativo ao nível 5%

** = significativo ao nível 1%

S = Massa de sólido fermentado, P = Concentração de substrato, T = Temperatura

F_{tab(2,2)} = 19,00

Para facilitar a interpretação dos dados, uma representação geométrica do sistema, envolvendo as variáveis e suas respostas, é apresentada na Figura 24. Estes resultados sugerem que a maior concentração de ácido D-galacturônico será obtida quando se utilizar 10% de pectina e 6 g de sólido fermentado e que o processo de hidrólise da pectina pode ser realizado à temperatura ambiente (entre 25 a 35 °C), sem comprometer os resultados.

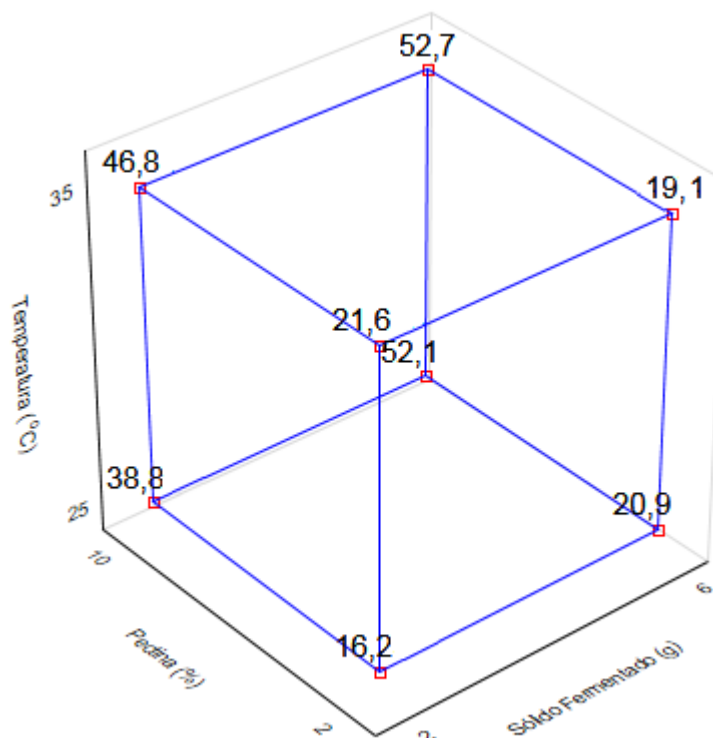


FIGURA 24 - INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS VALORES PREVISTOS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 PARA VARIÁVEL-RESPOSTA: TEOR DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA PECTINA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

Variáveis: Massa de sólido fermentado (2 g, Nível – e 2 g, Nível +); Teor de pectina (2%, Nível – e 10%, Nível +); e Temperatura (25 °C, Nível – e 35 °C, Nível +). Condições de hidrólise: 72 h de reação, 180 rpm.

1.1.1 Variável-reposta: Conversão em Ácido D-galacturônico

Quanto à conversão da pectina em ácido D-galacturônico, é possível observar que todas as variáveis individuais (massa de sólido, teor de pectina e temperatura) apresentaram influência significativa no rendimento da reação (Tabela 9). Nas respostas obtidas, pode-se verificar valores de conversão acima de 100%, que podem ser devidos aos cálculos utilizados, que levaram em conta a composição mínima de ácido D-galacturônico na pectina, indicada pelo fabricante (74%). Porém, a possibilidade de haver teores maiores de ácido D-galacturônico deve ser levada em conta e será determinada experimentalmente em ensaios futuros.

O efeito individual mais significativo (-49,5) foi o parâmetro “teor de pectina” (P), que representa a quantidade de pectina utilizada como substrato no

ensaio. Quando este parâmetro passa de 2% ($m V^{-1}$) (nível inferior) para 10% ($m V^{-1}$) (nível superior), verifica-se uma diminuição de 49,5 unidades percentuais no rendimento da reação, ou seja, apresentou um efeito negativo na resposta. Isto era esperado e pode ser explicado pelo fato de haver muito mais pectina no meio, sendo a concentração de pectinases insuficiente para realizar uma conversão, ou então, que o tempo de 72 h não é suficiente para que ocorra a conversão máxima. Para elucidar esta última hipótese, foi realizada uma cinética de produção de ácido D-galacturônico, utilizando os níveis superiores (+1) deste ensaio, com maiores tempos de reação, cujos resultados estão apresentados mais adiante, no item 5.4.

O efeito da concentração de enzimas utilizada, ou seja, a “massa de sólido fermentado” (S) foi significativo em 10,0 unidades percentuais (Tabela 9). Ou seja, quando a quantidade de enzima passa do nível inferior (2 g) para o nível superior (6 g), há um aumento da conversão da pectina em ácido D-galacturônico, o que era de se esperar, já que há uma maior concentração de pectinases no meio reacional. Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas o parâmetro “massa de sólido fermentado”, valores altos são recomendados. O efeito de temperatura também se mostrou significativo (8,7 pontos percentuais); ou seja, aumento do nível inferior (25 °C) para o nível superior (35 °C) causa um acréscimo de apenas 8,7 unidades percentuais no rendimento da reação. Assim, pode-se dizer que as pectinases de *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 são catalisadores eficientes da reação de hidrólise da pectina, uma vez que podem produzir o ácido D-galacturônico até mesmo em temperaturas brandas (~30 °C).

Ainda na Tabela 9, analisando-se os efeitos de segunda ordem, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis verifica-se que não houve nenhum efeito sinérgico significativo na variável “conversão em ácido D-galacturônico”, ao contrário do que foi constatado para a variável “teor de ácido D-galacturônico” no meio reacional, onde a interação massa de sólido com concentração de pectina foi significativa.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 11) para a conversão em ácido D-galacturônico indicou que o modelo (Equação 4) é estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre a resposta e as variáveis

significativas, pois o valor do coeficiente de regressão é satisfatório ($R^2 = 0,94$). Este valor indica que 94% da variação da resposta pode ser atribuída a variáveis independentes e somente 6% da variação total não pode ser explicada pelo modelo, o que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais (Figura 25).

TABELA 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EQUAÇÃO PREVISTA PARA A CONVERSÃO DA PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO COM *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 COMO BIOCATALISADOR.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p
S	200,302	1	200,302	27,6581	0,0343*
P	4909,572	1	4909,572	677,9240	0,0014**
T	157,269	1	157,269	21,7160	0,0430*
Falta de Ajuste	351,085	5	70,217	9,6957	0,0961
Erro Puro	14,484	2	7,242		
Total SS	5632,712	10		$R^2 = 0,94$	

* = significativo ao nível 5%

** = significativo ao nível 1%

S = Massa de sólido fermentado, P = Concentração de substrato, T = Temperatura

F_{tab} (5,2) = 19,3

A falta de ajuste para a regressão não foi significativa ($p = 0,096$) ao nível de 5%, indicando que a equação prevista (Equação 4) pode ser usada para qualquer combinação dos valores das variáveis estudadas.

$$Y = 86,5 + 10,0S - 49,5P + 8,9T \quad (\text{Equação 4})$$

Outra forma de avaliar o modelo estatístico utilizado na análise de variância é por meio dos erros de ajuste, que devem ser independentes e normalmente distribuídos. Isto pode ser demonstrado por meio do gráfico de ensaios por resíduos (Figura 25 A e B), onde se observa uma distribuição aleatória entre os resíduos dos ensaios, sugerindo resíduos independentes.

A representação gráfica dos resultados deste conjunto de experimentos (Figura 26 A, B e C) mostra as tendências previstas pelo modelo matemático, onde a concentração de pectina é a variável mais importante: seu aumento no meio causa uma diminuição na percentagem de conversão em ácido D-

galacturônico; ou seja, como a concentração de pectina no meio aumenta, parte dela permanece no meio sem ser hidrolisada, uma vez que a percentagem de conversão é calculada em relação à pectina total adicionada. Isto pode ser devido ao tempo de incubação (72 h), que não foi suficiente para converter a pectina; devido à quantidade de sólido fermentado (biocatalisador), que pode não ser suficiente para converter a massa de pectina; ou ainda o efeito de inibição das enzimas pelo substrato.

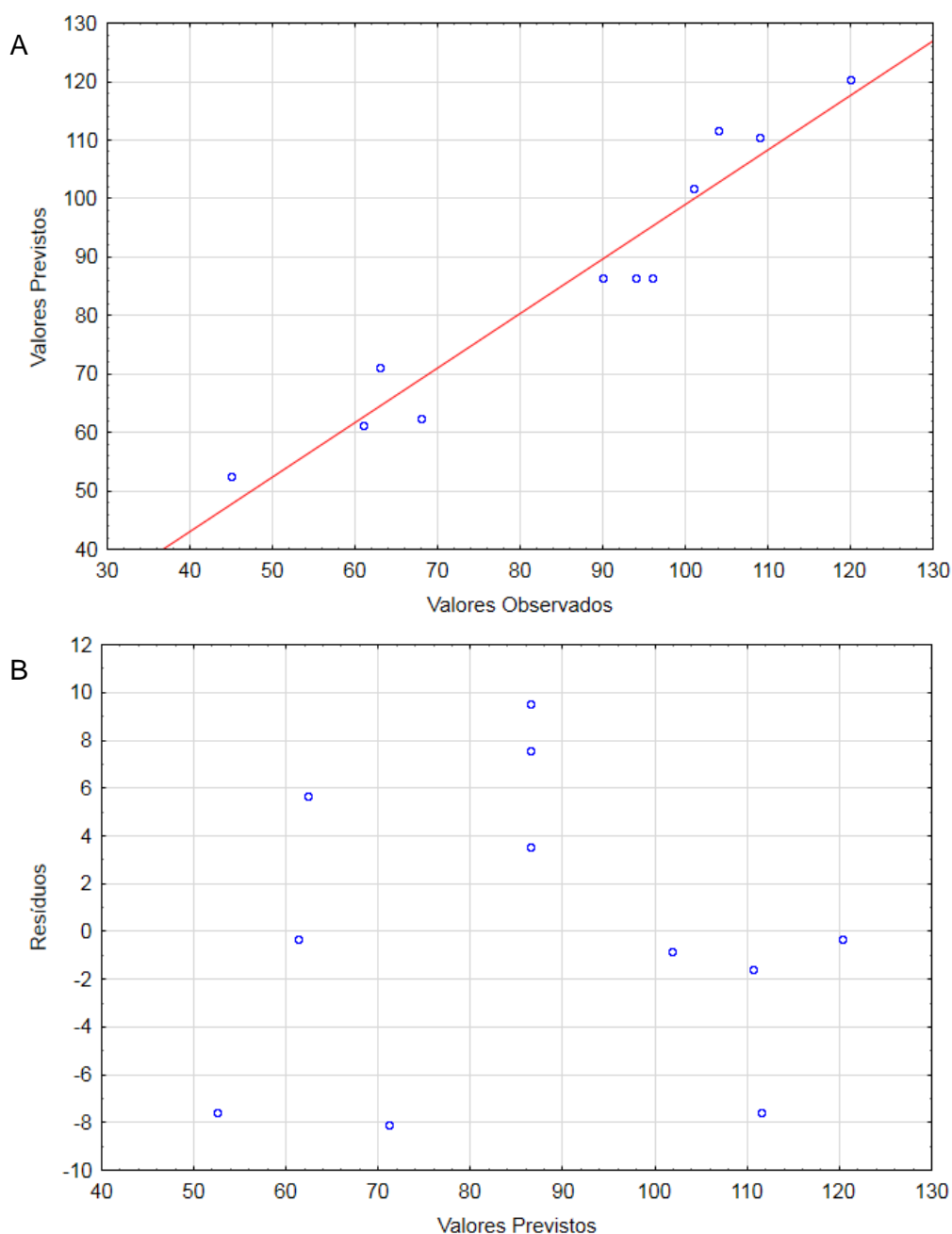


FIGURA 25 – VALORES PREVISTOS E OBSERVADOS (A) E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS (B) FORNECIDOS PELO MODELO, PARA A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO DE PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO.

As melhores condições de conversão da pectina sugeridas pelo modelo matemático foram: maior massa de sólido fermentado (6 g) e uma concentração de pectina de até 5% a uma temperatura de 35°C. Entretanto, como maiores teores de ácido D-galacturônico são desejáveis, foi estudada a hidrólise da pectina em concentrações mais altas (de 10 a 20%).

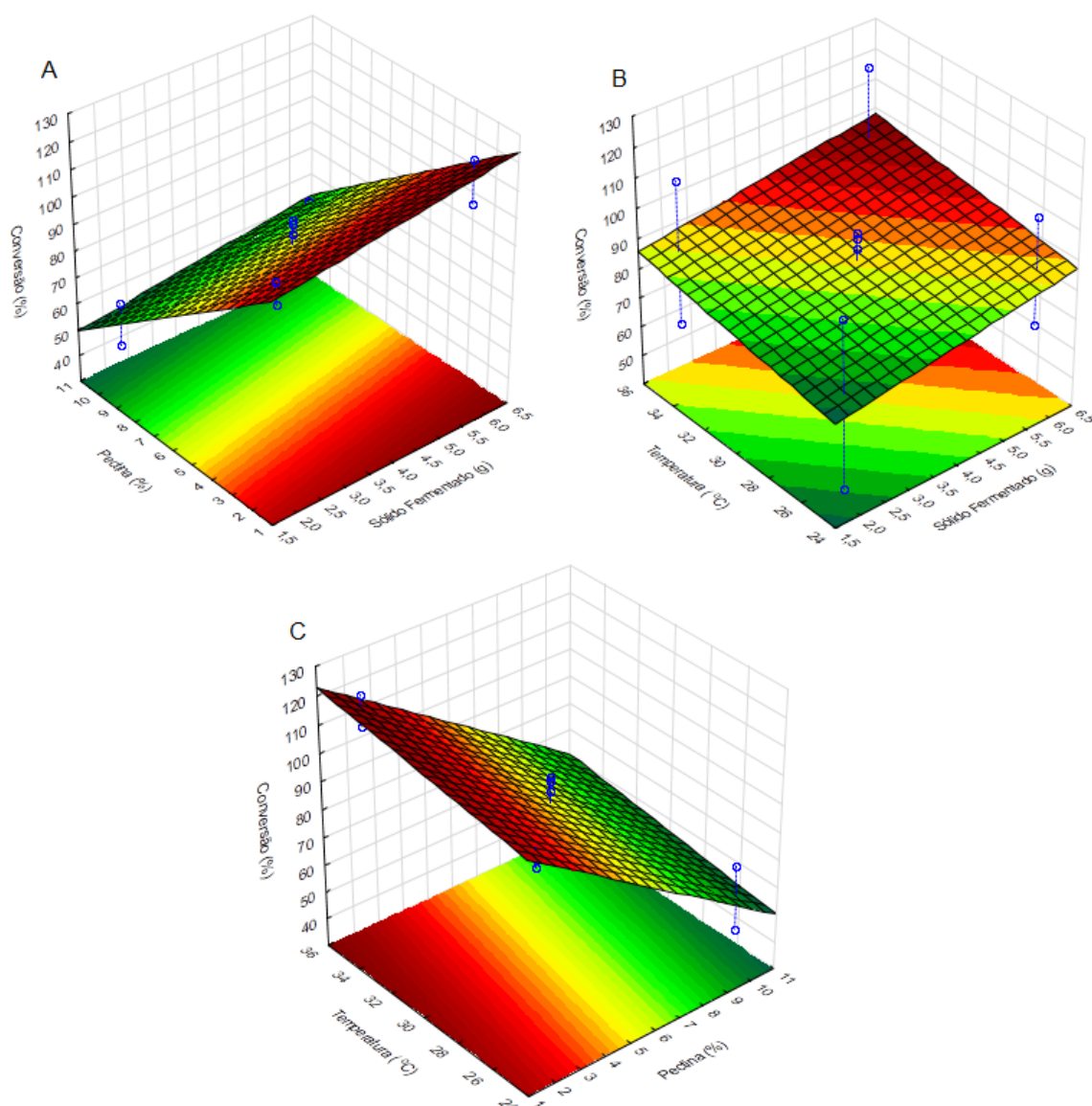


FIGURA 26 – RELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS AVALIADOS NA RESPOSTA DE CONVERSÃO DA PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO.

Na avaliação de pectina e sólido fermentado (A) a temperatura foi fixada em 30 °C; de sólido fermentado e temperatura (B) o teor de pectina foi fixado em 6%; e de teor de pectina e temperatura (C) a massa de sólido fermentado foi fixada em 4 g.

5.4 ESTUDOS DE HIDRÓLISE COM MAIORES TEORES DE PECTINA

Tendo em vista os resultados anteriores, e como o principal objetivo deste trabalho é a produção de ácido D-galacturônico a partir da pectina, foram realizadas cinéticas de hidrólise com maiores concentrações de pectina no meio, com reações conduzidas a 35°C a 180 rpm. A massa de sólido fermentado foi aumentada proporcionalmente à concentração de pectina no meio, tendo como base a razão “pectina:massa de sólido fermentado” utilizada no nível superior destas variáveis no delineamento fatorial (10% de pectina para 6 g de sólido). Assim, foram feitos experimentos com 15% de pectina e 9 g de sólido e 20% de pectina com 12 g de sólido. As reações foram acompanhadas até atingir-se o equilíbrio da reação (Figuras 27 e 28).

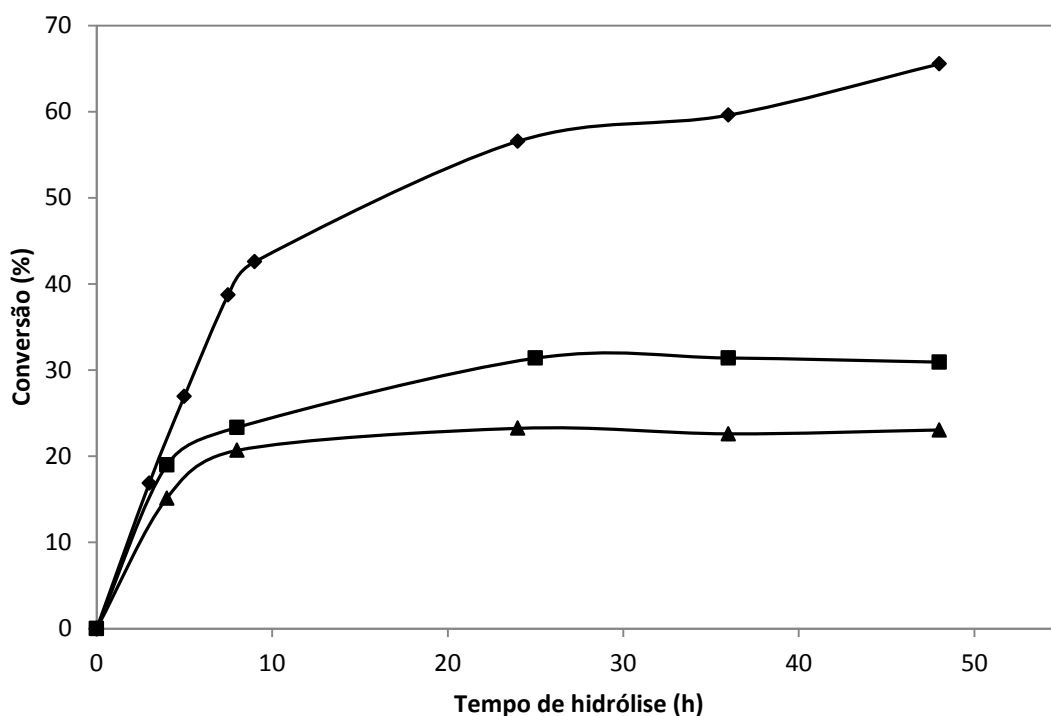


FIGURA 27 – CONVERSÃO DE PECTINA EM ÁCIDO D-GALACTURÔNICO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. Reações de hidrólise conduzidas em 50 mL de meio reacional, 10% (m V⁻¹) e 6 g de sólido (◆); pectina 15% (m V⁻¹) e 9 g de sólido (■); pectina 20% (m V⁻¹) e 12 g de sólido (▲). Condições de hidrólise: 35 °C e 180 rpm. Quantificação do ácido D-galacturônico realizada por CLAE.

Pode-se verificar que a maior conversão (63%) foi obtida para a menor concentração de pectina (10%), o que não está de acordo com o resultado previsto pelo modelo matemático, pois era esperada uma conversão de apenas

37%. De fato, ocorre uma diminuição da conversão com o aumento da concentração de pectina no meio (Figura 27), sendo que após 10 h de hidrólise as reações tendem ao equilíbrio, particularmente para as concentrações de 15% e 20%, onde foram obtidas conversões similares (aprox. 20%), independentemente do aumento da concentração da pectina.

Avaliando-se o teor de ácido D-galacturônico (Figura 28), pode-se observar que as velocidades iniciais da reação e o teor de ácido D-galacturônico após 10 h (aproximadamente 30 g L^{-1}) são similares para as três concentrações estudadas. Entretanto, quando se utilizou a menor concentração de pectina no meio (10%), a reação prossegue por mais tempo, gerando, ao final de 48 h, um teor de 49 g L^{-1} , enquanto que, para as outras duas condições, o teor máximo foi de 32 g L^{-1} . Estes resultados sugerem que há inibição das pectinases por excesso de substrato. Entretanto, também podem ser devidos à alta viscosidade do meio, conferida pelo elevado teor de pectina, que pode ter causado problemas de transferência de massa, diminuindo o contato da enzima com o seu substrato.

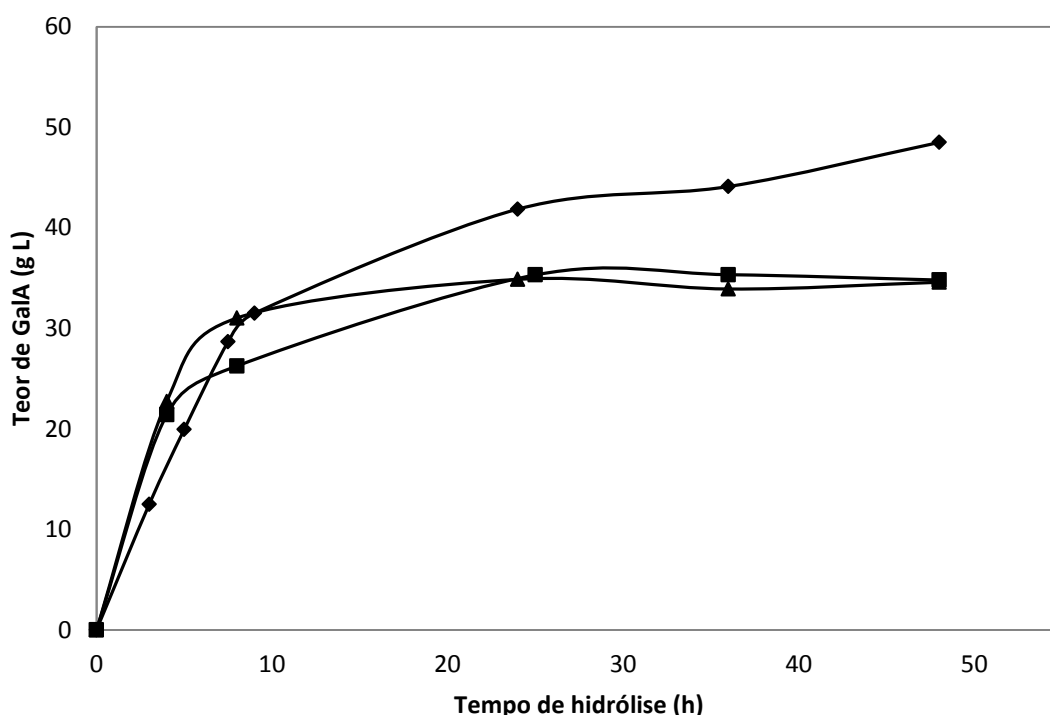


FIGURA 28 - CINÉTICA DE HIDRÓLISE DA PECTINA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO produzido por *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

Reações de hidrólise conduzidas em 50 mL de meio reacional, 10% (m V^{-1}) e 6 g de sólido (♦); pectina 15% (m V^{-1}) e 9 g de sólido (■); pectina 20% (m V^{-1}) e 12 g de sólido (▲). Condições de hidrólise: $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 180 rpm. Quantificação do ácido D-galacturônico realizada por CLAE.

5.5 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS APÓS AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE DA PECTINA

5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para avaliação do perfil dos carboidratos produzidos durante a hidrólise enzimática da pectina, foi, inicialmente, realizada a análise qualitativa por CCD. O experimento de hidrólise foi realizado com 20% de pectina, 12 g de sólido fermentado, a 35 °C, com agitação de 180 rpm e volume total do meio reacional de 50 mL e 72 h de incubação, obtendo-se uma conversão de 23% (levando-se em conta que cada grama de pectina teria 0,74 g de ácido) e um teor de ácido D-galacturônico de 34 g L⁻¹. Como esta condição, de fato, não era satisfatória para a hidrólise da pectina, este experimento deverá ser repetido para concentrações menores de pectina para confirmação dos resultados.

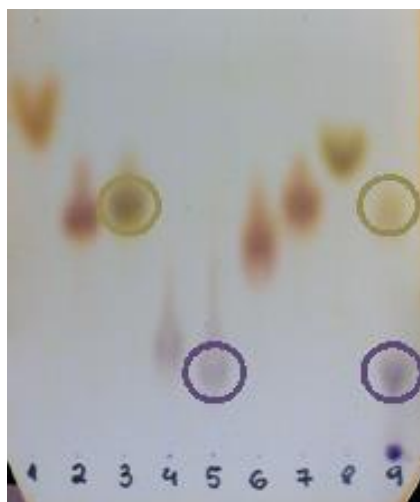


FIGURA 29 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO HIDROLISADO DA PECTINA OBTIDO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01

1 - Ramnose, 2 - Glucose, 3 - Arabinose, 4 - Ácido Glucurônico, 5 - Ácido D-Galacturônico, 6 - Galactose, 7 - Manose, 8 - Xilose, 9 –hidrolisado da pectina. Condições de hidrólise: pectina 20% (m V⁻¹), 12 g de sólido fermentado, 35 °C, 180 rpm e 72 h de reação.

Pode-se verificar que, além do ácido D-galacturônico, a amostra hidrolisada apresentou outros açúcares em sua composição. Como os fatores de retenção para a glucose, arabinose e manose são similares, não pode ser concluir

neste resultado, quais deles estariam presentes no hidrolisado (Figura 29). Outros açúcares não foram detectados por CCD, talvez por estarem presentes em menor concentração em relação ao ácido D-galacturônico. Portanto, foi realizada a análise do hidrolisado por CG-EM, que é um método de análise mais preciso.

5.5.2 Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-EM)

A quantificação e confirmação dos açúcares presentes no hidrolisado, preparado como descrito no item anterior, foi feita nas amostras derivatizadas a acetais, por GC-EM. Comparando-se a amostra e o padrão de açúcares (monossacarídeos) (Figura 30), pode-se verificar que no hidrolisado estão presentes a arabinose (tempo de retenção, Tr: 8,67), a manose (Tr: 12,60) e a glucose (Tr: 13,73).

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO HIDROLISADO DE PECTINA^a OBTIDO UTILIZANDO COMO CATALISADOR O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01

Açúcar	Composição (%) ^b	Teor (g L ⁻¹) ^c
Ácido D-galacturônico	-	34,0
Arabinose	54,5	6,5
Manose	7,8	0,9
Glucose	37,7	4,5

a: hidrólise da pectina realizada nas seguintes condições: 20% de pectina, 12 g de sólido fermentado, a 35 °C, com agitação de 180 rpm e volume total do meio reacional de 50 mL e 72 h de incubação;

b: Composição relativa de açúcares neutros da fração do hidrolisado de pectina, determinada por CG-EM, calculada pela soma da área todos os picos (100%) da Figura 29.

c: g L⁻¹ do hidrolisado após centrifugação para remoção da pectina residual. Cálculo realizado a partir do valor de ácido D-galacturônico obtido na hidrólise da pectina (34 g L⁻¹).

O ácido D-galacturônico não é visualizado no cromatograma porque não foi retido pela coluna, pois no método de derivatização não foi utilizado um agente redutor suficientemente forte para reduzir o grupo carboxila. Assim sendo, a quantificação dos açúcares presentes no hidrolisado da pectina foi realizada por diferença, considerando que 74% são de ácido D-galacturônico, como descrito pelo fabricante da amostra de pectina utilizada (Sigma), e outros 26%

correspondem aos outros açúcares liberados durante a hidrólise (Tabela 12). A condição utilizada nos ensaios de hidrólise (20% de pectina e 12 g de sólido) resultou em uma conversão em ácido D-galacturônico de apenas 23%, e a partir deste resultado os teores dos demais açúcares presentes no hidrolisado foram calculados.

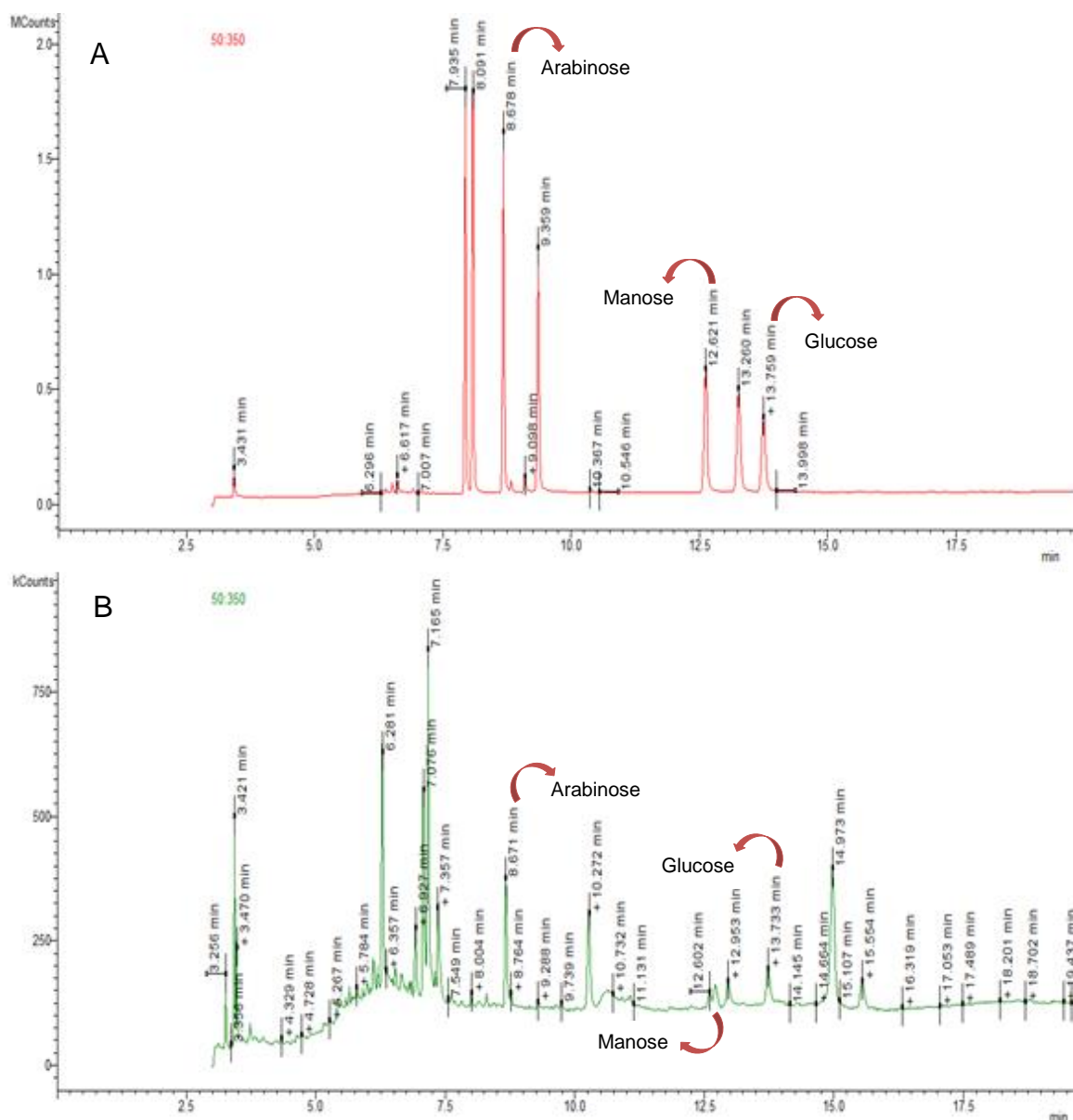


FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA a ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM). (A) PADRÕES DE AÇÚCARES, (B) HIDROLISADO DA PECTINA OBTIDO UTILIZANDO COMO CATALISADOR O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

A arabinose é uma matéria-prima importante na indústria farmacêutica e na química orgânica de síntese. Este açúcar é um precursor de várias substâncias bioativas, tais como antibióticos. Na indústria de alimentos, a arabinose pode ser utilizada como estabilizante e espessante. Atualmente, a arabinose é produzida principalmente pela hidrólise da goma arábica, um material escasso e caro. Como a demanda por arabinose vem aumentando e as fontes de goma arábica são limitadas, o preço de arabinose poderá aumentar cada vez mais. Portanto, um meio de produzir a arabinose de forma barata é essencial, como por hidrólise de materiais baratos como a polpa de cítrica e polpa de beterraba, que são ricas em pectina (WU et al., 2011). A pectina tem em torno de 11% de arabinose em sua composição (GARNA et al., 2004) e este corresponde ao açúcar mais abundante dentre os açúcares neutros presentes na pectina (MIN et al., 2011). No presente trabalho, 3,25% dos monômeros liberados na hidrólise da pectina foram de arabinose. Porém, melhores resultados podem ser obtidos, com uma hidrólise mais efetiva da pectina. Leijdekkers e colaboradores (2013) também verificaram a presença de arabinose no hidrolisado de beterraba sacarínica, em conversões de até 82%. Além da presença de arabinose, trabalhos demonstraram a presença de glucose e manose no hidrolisado ácido de pectina de beterraba (OOSTERVELD et al., 1996), e na hidrólise enzimática da casca de laranja (TALEBNIA et al., 2008). A hidrólise da casca de laranja liberou 18,7% (m m^{-1}) de ácido D-galacturônico, 7,1 % de arabinose e 27,1% de glucose. Estes resultados são de difícil comparação, já que neste trabalho foi hidrolisada a pectina pura obtida comercialmente, e não casca de laranja, que contém outras fontes de carboidratos, além da pectina.

Há na literatura estudos da hidrólise de materiais pécticos, como a polpa de beterraba sacarínica, para a obtenção de ácido D-galacturônico, cuja conversão chega a 79%, partindo de um teor de matéria seca inicial de cerca de 7,5% (m/m), em um biorreator de 10 L a 45 °C, por 48 h (LEIJDEKKERS et al., 2013). Porém, todos os estudos de hidrólise da pectina ou materiais pécticos encontrados na literatura utilizam enzimas pectinolíticas adquiridas comercialmente (BÉLAFI-BAKÓ et al., 2006; BÉLAFI-BAKÓ et al., 2007; KISS et al., 2009; MOLNÁR, NEMESTÓTHY, BÉLAFI-BAKÓ, 2010). Poucos destes trabalhos desenvolvem estudos de liberação de outros monossacarídeos, além do ácido D-galacturônico (LEIJDEKKERS et al., 2013).

O uso de pectinases produzidas por fermentação em estado sólido na hidrólise da pectina visando à produção de monossacarídeos de alto valor agregado não é explorado em estudos disponíveis na literatura. Considerando que o uso de pectinases comerciais pode dificultar a implantação de processos de hidrólise enzimática devido ao seu alto custo, os resultados obtidos neste trabalho são de grande importância, já que a hidrólise da pectina utilizando sólidos fermentados com atividade pectinolítica produzidos por *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 foi satisfatória para a produção de açúcares de interesse, principalmente o ácido D-galacturônico.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, desenvolveu-se um método de hidrólise de pectina cítrica utilizando sólidos fermentados com atividade pectinolítica, para produção de ácido D-galacturônico e outros açúcares de importância industrial, como a arabinose. Os resultados obtidos em escala de bancada com a pectina cítrica comercial poderão servir como base para estudos futuros de hidrólise da biomassa com aplicação em biorrefinarias de resíduos cítricos.

Esta conclusão está baseada nos seguintes resultados:

(I) Seleção de micro-organismo e condições de fermentação

O micro-organismo *Aspergillus oryzae*, isolado no Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática e crescido no meio contendo bagaço de laranja lavado (70%) e bagaço de cana de açúcar (30%), a 30 °C e umidade inicial de 70%, apresentou melhores resultados de atividade pectinolítica, destacando-se entre os demais micro-organismos estudados; o melhor tempo de fermentação foi de 24 h.

(II) Adequação e otimização do método de dosagem de atividade pectinolítica diretamente no sólido fermentado

O sólido fermentado liofilizado apresentou maior atividade pectinolítica do que o extrato obtido do mesmo material. As melhores condições para o teste de dosagem foram: 20 mg de sólido fermentado, pH do meio a 4,5 utilizando tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, solução de pectina 1,0%, incubação a 50 °C, por 5 min.

(III) Hidrólise da pectina cítrica

A utilização do sólido fermentado por *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 na hidrólise da pectina foi possível. Em estudos preliminares, obtiveram-se conversões de 92% em ácido D-galacturônico quando se utilizou 2% (m/V) de pectina.

A otimização da hidrólise sugeriu que maiores teores de ácido D-galacturônico são obtidos quando se utilizam maiores concentrações de substrato e maior massa de sólido fermentado, em meios contendo até 10% (m V⁻¹) de pectina. Neste caso, a temperatura não se mostrou significativa. Já para a conversão em ácido D-galacturônico, o teor de pectina no meio se mostrou bastante significativo, com um efeito negativo. O efeito da massa de sólido fermentado e da temperatura se mostrou significativo e positivo, porém com menor significância.

No hidrolisado enzimático da pectina foram encontrados, além do ácido galacturônico, arabinose (3,25%) a manose (0,46%) e a glucose (2,25%), segundo determinação por CG-EM. Assim, o uso do sólido fermentado na hidrólise da pectina cítrica se mostrou promissor para obtenção de outros açúcares além do ácido D-galacturônico.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a eficiência catalítica de sólidos fermentados produzidos por *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 no processo de hidrólise da pectina cítrica, abrindo perspectivas de utilização destes biocatalisadores em processos industriais. Entretanto, mesmo que os estudos mostraram resultados promissores, ainda precisam ser aprofundados para viabilizar a implantação deste processo, e sendo assim, sugerem-se como estudos futuros:

- O aumento de escala da produção dos sólidos fermentados com atividade pectinolítica;
- Otimização do processo de hidrólise, estudando-se os seguintes parâmetros: a) custo do catalisador frente ao custo total do processo; b) estabilidade da enzima ao longo do processo; c) estudo da concentração dos substratos, a fim de permitir operar em concentrações não inibitórias; d) recuperação e purificação dos produtos (principalmente ácido D-galacturônico e arabinose);
- Estabilização da atividade pectinolítica por imobilização efetiva das enzimas nos substratos sólidos, visando permitir a reutilização do biocatalisador nos processos de hidrólise da pectina;
- Aumento de escala do processo de hidrólise enzimática e da purificação dos produtos;
- Utilização do D-galacturônico em transformações biocatalíticas ou químicas, para obtenção de produtos de maior valor agregado, como o ácido L-galactônico e *meso*-galactárico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRO, F. Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1525–1537, 2011.

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

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–61, 2010.

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

ANTÔNIO, L. F. **Hidrólise ácida de polissacarídeos de microrganismos para produção de etanol**. Ribeirão Preto, 99p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental). Universidade de Ribeirão Preto, 2010.

BARON, A. **Hidrólise de pectina para produção de ácido D-galacturônico como um intermediário chave em uma biorrefinaria: Produção de pectinases por fermentação em estado sólido**. Relatório apresentado ao CNPq referente às atividades de Pós- Doutorado (PDJ/CNPq). Curitiba, abril de 2010.

BATTISON, L. Nova técnica quer converter casca de laranja em biocombustível (BBC News, 2011). Disponível em: http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2011/09/110916_laranja_microondas_rw.shtml. Acesso em: 03/02/2013

BÉLAFI-BAKÓ, K.; ESZTERLE, M.; GUBICZA, L.; KISS K.; NEMESTÓTHY N. Utilisation of a membrane bioreactor for pectin hydrolysis by *Aspergillus niger* polygalacturonase. **Desalination**, v. 200, p. 507-508, 2006.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; GUBICZA, L.; KISS, K.; NEMESTÓTHY, N. Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 438-442, 2007.

BIZ, A. **Produção de pectinases por fermentação no estado sólido para a obtenção de ácido D-galacturônico em biorrefinarias**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012

BLAKE, J.D.; RICHARDS, G.N. Problems of lactonization in the analysis of uronic acid. **Carbohydrate Research**, v. 28, p. 275-281, 1968.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ, M.; SERRANO, L.; VINIEGRA, G.G. Fungal strain selection for pectinases production from coffee pulp in solid-state fermentation system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 22-26, 1994.

BOWERS, J. Food Theory and Applications. 2nd Edition. New York: Macmillan Publishing Company, 411p, 1992.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149–157, 2012.

CASTILHO, L.R.; ALVES, T.L.M.; MEDRONHO, R.A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, p.181 - 186, 1999.

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

COENEN, G. J.; KABEL, M. A.; SCHOLS H. A.; VORAGEN, A.G.J. CE–MSn of complex pectinderived oligomers. **Electrophoresis**, v. 29 p. 2101–2111, 2008.

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

DI MATTEO, A.; SACCO, A.; ANACLERIA, M.; PEZZOTTI, M.; DELLEDONNE, M.; FERRARINI, A.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. **BMC Plant Biology**, v. 10:163, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus Fruit Fresh and Processed Annual Statistics (2012). Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf. Acesso em: 23/02/2013.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-graduação em Química; Universidade Federal do Paraná, 120 p., 2007

FONTANA, R.C., POLIDORO, T.A., DA SILVEIRA, M.M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4493–4498, 1989.

GADRE, R.V., DRIESSCHE, G.V., BEEUMEN, J.V., BHAT, M.K. Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 321–330, 2003

GARNA, H.; MABON, N.; NOTT, K.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry**, v. 96, p. 477-484, 2006.

GARNA, H.; MABON, N.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4652–9, 2004.

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

GERGELY, S.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. The use of multiobjective optimisation to improve wine filtration. **Journal of Food Engineering**, v. 58, p. 311–316, 2003.

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

GROHMANN K; BALDWIN E.A. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulose enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 1169-1174, 1992.

GROHMANN, K.; CAMERON, R.G.; BUSLIG, B.S. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45 p. 315-327, 1994.

HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHOIRE, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 102–110, 2012.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal** 293, 781-788, 1993.

IBGE. Estatística da Produção Agrícola. Dezembro de 2012. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201212.pdf. Acesso em: 15/01/2013.

JACOB, N., NILADEVI, K. N., ANISHA, G. S., & PREMA, P. Hydrolysis of pectin: an enzymatic approach and its application in banana fiber processing. **Microbiological Research**, v.163, p. 538–44, 2008.

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

KAMM, B.; KAMM M. Biorefineries: multi product processes. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v 105, p. 175-204, 2007.

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

KASTNER, U.; GLASL, S.; FOLLRICH, B.; GUGGENBICHLER, J.P.; JURENITSCH, J. Acid oligosaccharides as the active principle of aqueous carrot extracts for prevention and therapy of gastrointestinal infections. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 152, p. 379-381, 2002.

KERTESZ, Z. I. The Pectic Substances. New York: Interscience Publishers, 628 pp, 1951.

KILARA, A. Enzymes and their uses in the processed apple industry: A review. **Process Biochemistry**, v. 23, p. 35-41, 1982.

KING, D., INDERWILDI O. R., WILLIAMS A. The future of industrial biorefineries **World Economic Forum**, Genebra, Suíça, 2010.

KISS, K.; NEMESTÓTHY, N.; GUBICZA, L.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Vacuum assisted membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of pectin from various agro-wastes. **Desalination**, v. 241, p. 29–33, 2009.

KOBAYASHI, T., HIGAKI, N., YAJIMA, N., SUZUMATSU, A., HAGIHARA, H., KAWAI, S., ITO, S. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, p. 842–847, 2001.

LARIOS, G.; GARCIA, J. M.; HUITRON, C. Endo-poly galacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 729–734, 1989.

LEIJDEKKERS, A.G.M.; BINK, J.P.M.; GEUTJES, S.; SCHOLS, H.A.; GRUPPEN, H. Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose: A study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 518–525, 2013.

LINDE, G. A. ; MAGAGNIN G.; Costa, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLAUTO, N. B. Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid

substrate cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 557-562, 2007.

LOHRASBI M.; POURBAFRANI C.; NIKLASSON C.; TAHERZADEH M.J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 7382-7388, 2010.

LOPEZ, A.J.S.; LI Q.; THOMPSON I.P. Biorefinery of waste orange peel. **Critical Reviews in Biotechnology** v. 30, p. 63-69, 2010.

LÓPEZ, N.; PERNAS, M.A.; PASTRANA, L.M.; SANCHEZ, A.; VALERO, F.; RUA, MARIA L. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 65-73, 2004.

MALDONADO, M. C.; SAAD, A. M. S. Production of pectin esterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 34–38, 1998.

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

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2373-2383, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura - Saiba Mais. 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus/saiba-mais>. Acesso em: 19/01/2013.

MARTIN, N.; GUEZ M.AU.; SETTE L.D.; SILVA R.; GOMES E. Pectinase production by a brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid state and submerged fermentation. **Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 306-313, 2010.

MARTÍNEZ, M.; GULLÓN, B.; YÁÑES, R.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C. Kinetic assessment on the autohydrolysis of pectin-rich by-products. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 480–486, 2010.

MICARD, V.V.; GRABBER, J. H.; RALPH, J.; RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J. F. Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1365-1368, 1997.

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

MIN, B.; LIM, J.; KO, S.; LEE, K-G.; LEE, S H.; LEE, S. Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3855–3860, 2011.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIČ, M. Solid-State Fermentation Bioreactors - Fundamentals of Design and Operation. Heidelberg, Springer, 447 pp, 2006.

MOHAMED, S.A., CHRISTENSEN, T.M.I.E., MIKKELSEN, J.D. New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: Characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 515–524, 2003.

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

MOJZITA, D., WIEBE, M., HILDITCH, S., BOER, H., PENTTILA, M., RICHARD, P. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169-175, 2010.

MOLNÁR E.; NEMESTOTHY N.; BELAFI-BAKO K. Utilization of bipolar electro dialysis for recovery of galacturonic acid. **Desalination** v. 250, n. 3, p. 1128-1131, 2010.

MOYO, S., GASHE, B.A., COLLISON, E.K., MPUCHANE, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 87–100, 2003.

OBEROI, H. S., SANDHU, S. K., & VADLANI, P. V. Statistical optimization of hydrolysis process for banana peels using cellulolytic and pectinolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 257–265. 2012

OHARA, H. Biorefinery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 474-477, 2003.

OOSTERVELD, A.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 288, p.143–153, 1996.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; PEREZ-MAETEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209-217, 2004.

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

PATIL S.R.; DAYANAND A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2054-2058, 2006.

PEREZ S.; RODRIGUEZ-CARVAJAL M.A.; DOCO P.A. A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturan II. A structure in quest of a function. **Biochimie**, v.85 p. 109-121, 2003.

PHUTELA U.; DHUNA V.; SANDHU S.; CHADHA B.S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36 p. 63-69, 2005.

PRASSANA, V.; PRABLA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Fruit ripening phenomena – An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 1-19, 2007.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

RASERA, K.; OSÓRIO, N. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 75-81, 2012.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. 2ª edição. São Paulo: Edgard Blücher, 196 pp, 2007.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597-604, 2009.

RODRÍGUEZ-NOGALES, J.M.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. **Food Chemistry**, v. 101, p. 634-642, 2007.

RODRÍGUEZ-NOGALES, M.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M; BUSTO, M. D. Pectin hydrolysis in a free enzyme membrane reactor: An approach to the wine and juice clarification. **Food Biochemistry**, v. 107, p. 112-119, 2008.

RÜKOLD, S.; GROBECKER, K. H.; ISENGARD, H. D. The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. **Food Control**, v. 12, p. 401- 407, 2001.

SAEMAN, J. S.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E.I. Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and application. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-94, 1993.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; COCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SCHWAN, R.F.; COOPER, R.M.; WHEALS, A.E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 234-244, 1997.

SERRAT, M.; BERMÚDEZ, R.C.; VILLA, T.G. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.97, n.3, p.193-208, 2002.

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

SILVERMAN, R. B. The organic chemistry of enzyme-catalysed reactions. Edição Revisada, Academic Press, Waltham, 2002. 800 p.

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

SINGH, O.V.; KUMAR, R. Biotechnological production of gluconic acid: Future implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 713-722, 2007.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids. **Methods in Enzymology**, v. 35, p. 396-425, 1975

SOLÍS, S.; LOEZA, J.; SEGURA, G.; TELLO, J.; REYES, N.; LAPPE, P.; GUITÉRREZ, L.; RIOS, F.; HUIRÓN, C. Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 123-128, 2009.

SOLIS-PEREYRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIBRREZ-ROJAS, M; ROUSSOS,S; SAUCEDO-CASTAEDA, G.; GUNASEKARAN, P.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation at high initial glucose concentrations. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** v. 12, 257-260, 1996.

SOLIS-PEREYRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; GUTI M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 39, p. 36-41, 1993.

TALEBNIA F.; POURBAFRANI M.; LUNDIN M.; TAHERZADEH M.J. Optimization study of citrus waste saccharification by dilute acid hydrolysis. **Bioresources** v. 3, n.1, p. 108-122, 2008.

TASKIN, E.; ELTEM, R.; DA SILVA, E. S.; DE SOUZA, J.V.B. Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 6, p. 412-414, 2008.

TRIPODO, M. M.; LANUZZA, F.; MICALI, G.; COPPOLINO, R.; NUCITA, F. Citrus waste recovery: A new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 111-115, 2004.

TURQUOIS, T.; RINAUDO, M.; TARAVEL, F.R.; HEYRAUD, A. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: Influence of extrinsic parameters on their gelling properties. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.255-262, 1999.

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

USDA, 2011. Citrus: World markets and trade. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis. Janeiro, 2011. Disponível em: http://www.fas.usda.gov/htp/2011_Jan_Citrus.pdf. Acesso em: 17 Jan. 2012.

USTOK F.I.; TARI C.; GOGUS N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology** v. 127, p. 322-334, 2007.

VOLLHARDT K. P. C.; SCHORE, N. E.; Organic Chemistry - Structure and Function, 4th ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2003.

VRIES, J. de, in: WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O (Editores). Gums and Stabilisers for the Food Industry. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004, p. 23-31.

WERPY, T.; PETERSEN, G. Top Value Added Chemicals From Biomass - Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas (EERE, 2004). Disponível em: <http://www.ascension-publishing.com/BIZ/HD49.pdf>. Acesso em: 20/03/2011.

WIDMER, W.; ZHOU, W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, p. 5242–9, 2010.

WILKINS, M.R.; WILBUR, W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1614-1619, 2007.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into and old polymers are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p.211-215, 1963.

WU, R.; ZHANG, H.; ZENG, X.; ZHANG, J.; XIONG, H. L-Arabinose and oligosaccharides production from sugar beet pulp by xylanase and acid hydrolysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1907-1912, 2011.

YAMADA, H.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T. Recent studies on possible functions of bioactive pectins and pectic polysaccharides from medicinal herbs.

Advances in Pectin and Pectinase Research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Neth, 2003, pp. 481–490.

YOKOI, H.; OBITA, T.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Flocculation properties of pectin in various suspensions. **Bioresource Technology**, v.84, p.287-290, 2002.

ZHENG, Y.; CHENG, Y. S.; YU, C.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Improving the efficiency of enzyme utilization for sugar beet pulp hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 1531-9, 2012.

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

ZHONG-TAO S.; LIN-MAO T.; CHENG L.; JING-HUA D. Bioconversion of apple pomace into a multienzyme bio-feed by two mixed strains of *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology** v. 12, no. 1, p. 1-13, 2009.

APÊNDICE A

Preparo do reagente DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

Soluções:

1) 100 mL de solução NaOH 2 mol L⁻¹

2) 500 mL de DNS: são pesados 5 g de DNS (ácido 3,5 – dinitrosalicílico) e adiciona-se 100 mL de NaOH 2 mol L⁻¹. Em um becker de 500 mL são pesados 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolvidos em 250 mL de água destilada. A solução é levada ao aquecimento até dissolver completamente e a ela é adicionada a solução de DNS sob aquecimento, até dissolver completamente. Deixa-se esfriar e afere-se em balão de 500 mL com água destilada. A solução é armazenada em frasco escuro, ao abrigo da luz.

Curva padrão: na construção da curva padrão preparou-se uma solução mãe de ácido D-galacturônico na concentração de 1 mg mL⁻¹. Fazem-se diluições de 0,2; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,8 mg mL⁻¹. Transferiram-se 500 µL das soluções-padrão a 500 µL da solução de DNS. Os tubos são aquecidos a 100 °C por 5 min e então resfriados em banho com água e gelo. A cada tubo foram adicionados 4 mL de água destilada e, após homogeneização, a absorbância foi lida a 540 nm.

ANEXO I - Identificação de fungos filamentosos

As análises de identificação do fungo foram realizadas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na UNICAMP. O relatório de identificação da cepa isolada do maracujá segue abaixo.

1. Objetivos

Identificação de uma linhagem de fungo filamentoso utilizando sequenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene da calmodulina.

2. Metodologia utilizada

- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por de Raeder & Broda (1985).
- **Amplificação da região do gene da calmodulina.** A metodologia consistiu na amplificação pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das amostras. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram CF-1 e CF-4 para a amostra **CPQBA 394-12 DRM 01**.
- **Sequenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram CF1 e CF4.
- **Análise filogenética.** As sequências parciais do gene da calmodulina obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética

a partir das distâncias evolutivas, foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 reamostragens, utilizando o software de rotina incluído no MEGA 4.0.

3. Resultados

- O fragmento do gene da calmodulina da amostra **CPQBA 394-12 DRM 01** foi amplificado com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. O material foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido ao sequenciamento automático no sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystem).

- A sequência de DNA do gene da calmodulina obtida para a amostra **CPQBA 394-12 DRM** está apresentada no **Anexo I**. Esta sequência foi analisada usando a rotina BLAST do GenBank e o banco de dados do CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre*). A árvore filogenética construída a partir da sequência da amostra **CPQBA 394-12 DRM 01** e das sequências recuperadas no GenBank está apresentada na **Figura 1**.

- O resultado de identificação para a amostra está apresentado na tabela abaixo:

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 394-12 DRM 01	Fungo	<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) Cohn 1884

4. Comentários

A sequência parcial do gene da calmodulina da amostra **CPQBA 394-12 DRM 01** apresentou 99% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Aspergillus oryzae*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra **CPQBA 394-12 DRM 01**

no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *A. oryzae*, suportado por um *bootstrap* de 94% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura **CPQBA 394-12 DRM 01** foi identificada como *Aspergillus oryzae*. Ressaltamos que o sequenciamento do gene da calmodulina tem sido indicado para análise taxonômica molecular do gênero *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2007). A título de informação complementar, gostaríamos de mencionar que após compararem o genoma total das espécies *A. flavus* e *A. oryzae*, alguns autores sugeriram que a segunda tenha resultado da domesticação da primeira em virtude do alto grau de similaridade encontrado entre estas taxa (Payne *et al.*, 2006).

- **Referências Bibliográficas**

Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120, 1980

Payne GA et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Medical Mycology*, 44:S9 – S11, 2006.

Raeder, J.; Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20, 1985.

Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425, 1987.

Samson RA, Varga J, Witiak SM, Geiser DM. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology*, 59: 71-73, 2007.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007) **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Thompson, J.D. Higgins, D.G. Gibson, T.J. Clustal, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680, 1994.

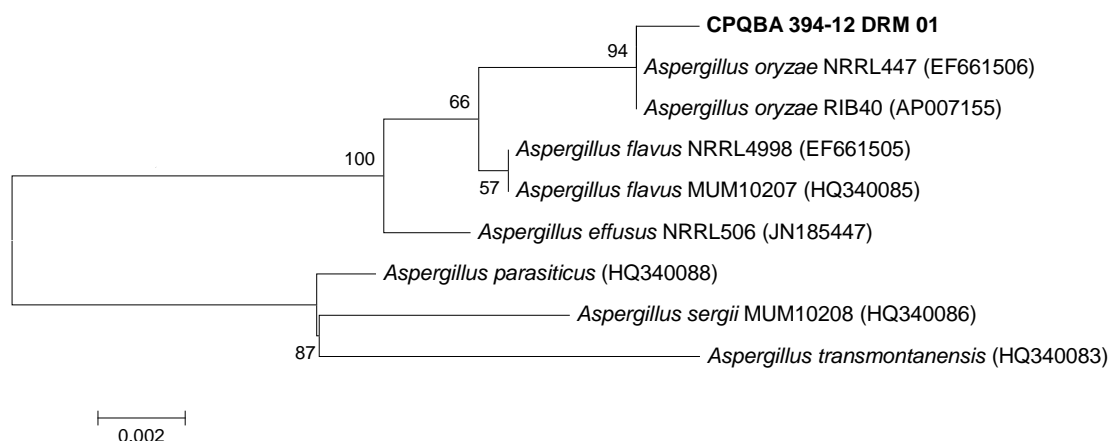


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene da calmodulina da amostra **CPQBA 394-12 DRM 01** e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I - Sequência parcial do gene da calmodulina da amostra analisada
>CPQBA 394-12 DRM 01

```

CAAGGAGGCCTTCTCCCTATTCGTAAGTAGTTATCGTCGTTTCGTGAAAATTGG
TTTTGTTAGTCGTCATGATTTGAACACAAGCTGACTTTGCTTTTCTTGGGTTTC
CTATAGGACAAGGACGGTGATGGTTAGTACAGTTTATTTATTCATTCTCCCAT
CAAATGCGATCAATATGTTTTAGCCGCCATAATTTTATCCAGTTTCTGTTCGAT
CGGCTGAAGTCTTGGCATTGATGAATTGACTTGATATGCAGGCCAGATCACC
ACCAAGGAGTTGGGCACTGTCATGCGCTCTCTGGGCCAAAACCCCTCTGAGT
CGGAECTCCAGGACATGATTAACGAGGTTGACGCCGACAACAATGGCACCAT
TGACTTCCCTGGTACGAGACGGCTTCCGTACGATTCATAAATGAAATAGCTGT
TAATGTTCAAATAGAGTTCCTGACGATGATGGCGAGAAAGATGAAGGATACC
GACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTC AAGTTTTTCGACCGCGATAACA
ACGGCTTCATCTCCGCTGCCGAATTGCGTACGTCATGACCTCCATCGGCCGA
GAAGCTTACCGATGACGAAGTTGATGAGATGATCCGCGAGGCGGATCAGGA
TGGTGACGGCCGGATTGACTGTACGTTTCGCGAAGCCCACCCAGACCCATTG
CGGCTGTAAAATGGTGATACTGACCGATT

```