UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ENZIMAS PECTINOLÍTICAS: SELEÇÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS PRODUTORAS, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM PROCESSOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

IVANA GREICE SANDRI

Caxias do Sul, 2010

IVANA GREICE SANDRI

ENZIMAS PECTINOLÍTICAS: SELEÇÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS PRODUTORAS, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM PROCESSOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira

Caxias do Sul, 2010

IVANA GREICE SANDRI

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira

TESE APROVADA EM 03 DE SETEMBRO DE 2010

_____

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

_____

Prof. Dr. Adriano Brandelli

_____

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

_____

Prof. Dr. Marília Amorim Berbert de Molina

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conduzir em meus caminhos, orientar em minhas decisões e estar sempre presente iluminando minha vida.

Ao professor Mauricio Moura da Silveira, pela orientação, pelos seus ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

À minha amiga Roselei Claudete Fontana, pela grande ajuda e amizade, em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

A todos meus colegas e amigos do Laboratório de Bioprocessos, pelos ótimos momentos que passamos juntos, em especial a Débora Menim Barfknecht e Cristiane Menegotto Toscan pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho experimental.

Aos funcionários do Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Enzimas e Biomassa e Laboratório de Óleos essenciais, pela disponibilização dos equipamentos.

Aos professores Aldo José Pinheiro Dillon e Sergio Laguna Echeverrigaray, pela disponibilidade em colaborar na elaboração deste trabalho.

Enfim, à minha família e ao Flávio por torcerem e me apoiarem na concretização deste sonho.

ÍNDICE

FIGURAS ..... **III**
QUADRO E TABELAS ..... **VI**
RESUMO ..... **X**
ABSTRACT ..... **XI**
1. INTRODUÇÃO **1**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **3**
2.1 Substâncias pécticas 3
2.2 Enzimas pectinolíticas 5
2.3 Produção de pectinases microbianas 7
2.3.1 Seleção de microrganismos produtores 8
2.3.2 Produção de pectinases em cultivo submerso e em estado sólido 9
2.4 Análise micotoxicológica das preparações enzimáticas 12
2.5 Aplicações das pectinases no processamento de alimentos 13
3. MATERIAL E MÉTODOS **17**
3.1 Microrganismos 17
3.2 Meios de cultivo 17
3.3 Isolamento de cepas obtidas de frutas e vegetais em decomposição 20
3.4 Identificação dos isolados fúngicos selecionados 21
3.5 Detecção de aflatoxinas 21
3.6 Condições experimentais 21
3.6.1 Obtenção do extrato enzimático bruto 22
3.6.2 Caracterização das preparações enzimáticas 23
3.6.3 Tratamento enzimático de sucos de frutas 23
3.7 Métodos analíticos 24
3.7.1 Amostragem e determinação do pH 24
3.7.2 Atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG) 24
3.7.3 Atividade de endo-poligalacturonase (endo-PG) 26
3.7.4 Determinação de açúcares redutores 28
3.7.5 Determinação da concentração celular em meios líquidos 28
3.7.6 Determinação da concentração celular em meios sólidos 29
3.7.7 Determinação da clarificação dos sucos 30
3.7.8 Determinação da redução de turbidez de sucos de frutas 30

3.7.9 Determinação da redução de viscosidade de sucos de frutas 31
3.7.10 Determinação de polifenóis totais 31
3.7.11 Determinação da atividade antioxidante total dos sucos 32
3.8 Análise estatística 32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.1 Seleção de fungos filamentosos para a produção de poligalacturonases 35
4.2 Produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* LB23 em cultivo em estado sólido 39
4.2.1 Influência do pH e da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 em cultivo sólido 42
4.2.2 Influência da pectina e da glicose sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* LB23 em cultivo em meio sólido 46
4.3 Produção de poligalacturonases por *Aspergillus fumigatus* LB39J em cultivo submerso 51
4.3.1 Influência do pH e da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J em cultivo submerso 56
4.3.2 Influência de glicose, de pectina e do pH inicial do meio sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus fumigatus* LB39J em cultivo submerso 60
4.4 Uso de pectinases fúngicas no tratamento de sucos de frutas 72
5. CONCLUSÕES 80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82
7. ANEXOS 94
7.1 Relatório técnico de identificação do *Aspergillus niger* LB23 94
7.2 Relatório técnico de identificação do *Aspergillus fumigatus* LB39J 96
7.3 Artigo enviado para LWT - Food Science and Technology 97

FIGURAS

Figura 1. A estrutura básica da pectina. Representação esquemática convencional (A) e da estrutura recentemente proposta (B) para pectina. 4
Figura 2. Mecanismo de formação do complexo pectina-proteína 14
Figura 3. Variação da atividade endo (A) e exo (B) poligalacturonase em função do tempo de processo, em cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 e *Aspergillus niger* T0005007-2. 40
Figura 4. Biomassa fúngica (A) durante 60 h e variação do pH (B) em função do tempo de processo, em cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 e *Aspergillus niger* T0005007-2. 40
Figura 5. Efeito do pH sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 (A) e (B) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise.. 43
Figura 6. Efeito da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 (A) e (B) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise.. 44
Figura 7. Estabilidade térmica das poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 (A) e (B) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (C) e (D), mantidas as demais condições padrão de cada análise.. 45
Figura 8. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo em estado sólido do *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de pectina. P0, P2, P6, P10, P12, P16, P20 e P25 - pectina: 0, 2, 6, 10, 12, 16, 20 e 25% (m/m) 47
Figura 9. Variação do pH em função do tempo de cultivo em estado sólido de A*spergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de pectina. 47
Figura 10. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante processo, no cultivo em estado sólido do *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de glicose. 49
Figura 11. Variação do pH em função do tempo de processo no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de glicose. 49
Figura 12. Variação da atividade de endo e exo-poligacturonase durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em meio

WB - endo-PG (A) e exo-PG (B) e em meio WBE - endo-PG (C) e exo-PG (D), em fermentador de bancada. 51

Figura 13 Variação da biomassa fúngica (X) durante as primeiras 48 h dos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em meio WBE. 52

Figura 14. Variação da concentração de açúcares redutores durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em meio WB (A) e WBE (B), em fermentador de bancada. 53

Figura 15. Variação da concentração de oxigênio dissolvido (%) durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus oryzae* IPT 301 e *Aspergillus fumigatus* LB39J em meio WB (A) e WBE (B), em fermentador de bancada. 54

Figura 16. Variação do pH durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus oryzae* IPT 301 e *Aspergillus fumigatus* LB39J em meio WB (A) e WBE (B), em fermentador de bancada. 54

Figura 17. Efeito do pH sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J (A) e (B) e *Aspergillus oryzae* IPT 301 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. Os valores correspondem à média de duplicatas. 57

Figura 18. Efeito da temperatura sobre as atividades de endo (A) e exo (B) poligalacturonase, produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J (A) e (B) e *Aspergillus oryzae* IPT 301 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. 58

Figura 19. Estabilidade térmica das poligalacturonases produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J (A) e (B) e *Aspergillus oryzae* IPT 301 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. 59

Figura 20. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de glicose. 61

Figura 21. Variação do consumo de açúcares redutores (A) e pH (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de glicose. 62

Figura 22. Variação da biomassa fúngica (X) durante 48 h do cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes concentrações glicose. 62

Figura 23. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de pectina. 64

Figura 24. Variação do consumo de açúcares redutores (A) e pH (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de pectina..... 65
Figura 25. Variação da biomassa fúngica (X) durante 48 h do cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes concentrações pectina..... 65
Figura 26. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes valores de pH iniciais do meio..... 67
Figura 27. Variação do consumo de açúcares redutores (A) e valores de pH (B) durante o processo, nos cultivos submersos de o *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes valores de pH iniciais do meio. 67
Figura 28. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, em fermentador de bancada. 69
Figura 29. Variação do oxigênio dissolvido (A) e pH (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, em fermentador de bancada. 70
Figura 30. Variação das concentrações de açúcares redutores (A) e biomassa fúngica (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, em fermentador de bancada. 70
Figura 31. Redução da viscosidade dos sucos de maçã (A) e mirtilo (B), utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação, nas temperaturas de 40 e 50°C, com diferentes tratamentos enzimáticos.. 73
Figura 32. Redução da turbidez (%) dos sucos de maçã (A) e mirtilo (B), utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação, nas temperaturas de 40 e 50°C, com diferentes tratamentos enzimáticos.. 74
Figura 33. Clarificação (%) dos sucos de maçã (A) e mirtilo (B), utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação, nas temperaturas de 40 e 50°C, com diferentes tratamentos enzimáticos. O..... 74
Figura 34. Efeito do tratamento enzimático no suco de maçã (A) e mirtilo (B) utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação a 40°C. 75

QUADRO E TABELAS

Quadro 1. Modo de ação das enzimas pectinolíticas.....7

Tabela 1. Concentrações de glicose e pectina avaliadas no cultivo em estado sólido..... 18
Tabela 2. Diferentes concentrações de glicose, pectina e valores de pH inicial do meio de cultivo submerso..... 20
Tabela 3. Diâmetros da colônia e halos, e a relação halo/colônia (H/ C) dos isolados fúngicos das linhagens padrão *Aspergillus niger* T0005007-2 e *Aspergillus oryzae* IPT .. 36
Tabela 4. Atividade de endo-poligalacturonase produzida em cultivos de isolados fúngicos e das linhagens padrão *Aspergillus niger* T0005007-2 em cultivo em estado sólido e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em cultivo submerso..... 37
Tabela 5. Resultados obtidos nos cultivos em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 e *Aspergillus niger* T0005007-2..... 41
Tabela 6. Resultados obtidos no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de pectina. 48
Tabela 7. Resultados obtidos no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de glicose..... 50
Tabela 8. Resultados obtidos nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 nos meios de cultivo WB e WBE. 55
Tabela 9. Resultados obtidos no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de glicose..... 63
Tabela 10. Resultados obtidos no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de pectina. 66
Tabela 11. Resultados obtidos no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes valores de pH iniciais..... 68
Tabela 12. Resultados obtidos nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J em fermentador de bancada..... 71
Tabela 13. Temperatura e pH ideal para ação da endo-PG presente nos extratos enzimáticos experimentais e nas preparações comerciais. 72
Tabela 14. Correlação (R^2) entre a redução da turbidez, viscosidade e aumento da clarificação dos sucos de maçã e mirtilo. 75
Tabela 15. Valores de pH dos sucos de maçã e mirtilo após o tratamento enzimáticos. ... 76

Tabela 16. Teores de polifenóis (FT) e atividade antioxidante (AAT) dos sucos de maçã e mirtilo. 77

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – redução percentual de viscosidade de solução de pectina

a e b – coeficientes da curva de calibração na análise de endo-poligalacturonase

Abs – absorbância

AR – açúcares redutores

AAT – atividade antioxidante total

C_{AG} – concentração de ácido galacturônico determinada pela curva padrão

cv – cultivar

dil – diluição aplicada à preparação enzimática

DNS – ácido 3,5 dinitrosalicílico

EAG – equivalentes de ácido gálico

Endo-PG – endo-poligalacturonase

Exo-PG – exo-poligalacturonase

FES – cultivo em estado sólido

FSm – cultivo submerso

FT – fenóis totais

H/C – relação entre os diâmetros da colônia e do halo formado

IC – Intensidade de cor

MC – meio de conservação sólido

MP – meio de identificação das linhagens pectinolíticas

P – atividade enzimática de endo- poligalacturonase

PB – Pectinex® BE Colour

PC – Pectinex®Clear

P_{exo} – atividade enzimática de exo-poligalacturonase

PG – poligalacturonases

PM – massa molecular do ácido galacturônico

t – tempo de reação

TE1 – extrato enzimático produzido por *A. niger* T000507-2 em FES

TE2 – extrato enzimático produzido por *A. oryzae* IPT 301 em FSm

TE3 – extrato enzimático produzido por *A. fumigatus* LB39J em FES

TE4 – extrato enzimático produzido por *A. niger* LB23 em FSm

U – unidade enzimática

v – volume de preparação enzimática utilizada na análise de endo-PG

V_e – volume de preparação enzimática diluída utilizada

Visc – viscosidade dos sucos

V_t – volume total na reação enzimática

WB – meio de produção de poligalacturonases formulado com farelo de trigo em FSm

WBE – meio de produção de poligalacturonases formulado com extrato de farelo de trigo em FSm

WBS – meio de produção de poligalacturonases formulado com farelo de trigo em FES

X – concentração de biomassa fúngica

RESUMO

Nesse trabalho, isolados fúngicos obtidos de vegetais em decomposição foram testados quanto à sua capacidade de produzir pectinases aplicáveis ao tratamento enzimático de sucos de maçã e de mirtilo. Com base na secreção de endo-poligalacturonase (endo-PG), dois isolados – identificados e denominados *Aspergillus niger* LB23 *e Aspergillus fumigatus* LB39J – foram selecionados para uso em processos em estado sólido e submerso, respectivamente. Os extratos enzimáticos dessas linhagens não apresentam teores de aflatoxinas totais (B1, B2, G1, G2) até um limite de detecção de 2 µg/Kg. A preparação enzimática obtida em cultivo em estado sólido de *A. niger* LB23 apresentou maiores atividades de endo-PG e exo-poligalacturonase (exo-PG) em pH 4,0, enquanto a reação enzimática com os extratos enzimáticos obtidos em cultivos submersos de *A. fumigatus* LB39J foram favorecidos em pH entre 4,0 e 5,0, para endo-PG, e 5,0, para exo-PG. Com relação à temperatura de reação da preparação pectinolítica de *A. niger* LB23, endo e exo-PG mostraram melhores desempenhos nas faixas 40-50°C e 50-60°C, respectivamente. Para as poligalacturonases de *A. fumigatus* LB39J, definiu-se um intervalo entre 40 e 60°C, para endo-PG, e 60ºC, para exo-PG, como as melhores temperaturas. Quando a estabilidade térmica das poligalacturonases presentes em ambas as preparações foi avaliada, observou-se preservação de cerca de 70% das atividades após 150 minutos de exposição a temperaturas de até 40ºC. Foi avaliada a influência de diferentes concentrações de glicose e pectina sobre os resultados do processo em cultivos em estado sólido com *A. niger* LB23, sendo observado incremento das atividades de endo e exo-PG em meio com 6% (m/m) de pectina e isento de glicose, atingindo-se 65 unidades por grama de meio seco (U/g) e 198 U/g, respectivamente. Em cultivos submersos com *A. fumigatus* LB39J, maiores atividades foram obtidas em meio com 20 g/L de pectina e sem glicose: 42 U/mL de endo-PG e 32 U/mL de exo-PG. Nas condições definidas para o processo submerso, foram testados diferentes valores de pH inicial do meio. As máximas atividades foram observadas com pH inicial 3,0 para endo-PG (44 U/mL) e 4,0 para exo-PG (37 U/mL). Adicionalmente, em fermentador de bancada, constatou-se que um valor de pH inicial de 4,0, com o valor mínimo sem controle e, após, com o valor máximo controlado em 3,5, proporcionou as maiores atividades com 81 U/mL de endo-PG e 49 U/mL de exo-PG. Comparando-se os extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens selecionadas, verificou-se que as pectinases produzidas por *A. niger* LB23 foram mais eficientes na hidrólise enzimática das substâncias pécticas presentes nos sucos de maçã e mirtilo, proporcionando, maior redução de turbidez (90 e 40%) e viscosidade (40 e 60%) e aumento na clarificação (90 e 55%). Esses resultados indicam o potencial das pectinases de *A. niger* LB23 para o tratamento enzimático de sucos de frutas, ressaltando-se que o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos sucos foram, em sua maior parte, preservados após o tratamento.

ABSTRACT

In this work, fungus samples isolated from decomposing vegetables were tested with respect to their capacity of producing pectinases to be applied to the enzymatic treatment of apple and bilberry juices. Taking in account the secretion of endo-polygalacturonase (endo-PG), two isolates – which were identified and named *Aspergillus niger* LB23 *e Aspergillus fumigatus* LB39J – were selected for solid-state and submerged cultivations, respectively. The enzymatic extracts from these strains did not present total aflatoxin (B1, B2, G1, G2) levels up to detection limit of 2 µg/Kg. The enzyme preparation obtained from solid-state cultivation of *A. niger* LB23 showed the largest activities of both endo-PG and exo-polygalacturonase (exo-PG) at pH 4.0, whereas the reaction with submerged *A. fumigatus* L39J enzymatic extracts was favoured at pH between 4.0 and 5.0 for endo-PG and 5.0 for exo-PG. With respect to the reaction temperature for *A. niger* LB23 pectinolytic preparation, endo and exo-PG showed the best performances at the ranges 40-50ºC and 50-60ºC, respectively. For *A. fumigatus* L39J polygalacturonases, a range from 40 to 60ºC, for endo-PG, and 60ºC, for exo-PG, were defined as the best temperatures. When the thermal stability of polygalacturonases present in both preparations was evaluated, preservation of about 70% of activities was observed after exposing the enzymes to temperatures up to 40ºC for 150 minutes. The influence of different glucose and pectin concentrations on the results of the solid-state process with *A. niger* LB23 was assessed and an increment in endo and exo-PG activities were observed in medium containing 6% (w/w) of pectin and absence of glucose, with activities of 65 units per gram of dry medium (U/gdm) and 198 U/gdm being achieved. In submerged cultivation of *A. fumigatus* LB39, highest enzyme activities were obtained in medium with 20 g/L of pectin and without glucose: 42 U/mL for endo-PG and 32 U/mL for exo-PG. In the conditions defined for the submerged process, different medium initial pH values were tested. Maximum activities were observed at initial pH of 3.0 for endo-PG (44 U/mL) and 4.0 for exo-PG (37 U/mL). Furthermore, in bench bioreactor, it was observed that an initial pH of 4.0, with uncontrolled minimum value and, afterwards, maximum value controlled at 3.5 led to the largest enzyme production with 81 U/mL of endo-PG and 49 U/mL of exo-PG. By comparing the enzymatic preparations produced by the selected strains, it was noticed that the pectinase produced by *A. niger* LB23 were more efficient for the hydrolysis of pectic substances present in both apple and bilberry juices, since it improved reduction of turbidity (90 and 40%) and viscosity (40 and 60%) and increasing clarification (90 and 55%), respectively. These results indicate the potential of *A. niger* LB23 pectinases for the enzymatic treatment of fruit juices, being remarkable that both the level of phenolic compounds and antioxidant capacity of juices were mostly preserved after treatment.

1. INTRODUÇÃO

O consumo e a industrialização de sucos clarificados têm apresentado grande expansão já que, em acréscimo ao consumo direto, os sucos clarificados também têm grande aplicação como constituintes em diversos produtos. O mercado de refrescos e bebidas prontas para consumo, repositores eletrolíticos, refrigerantes carbonatados, águas aromatizadas, *coolers* e bebidas isotônicas cresceu em ritmo intenso, sendo necessários sucos clarificados e novos sabores.

Somado a este mercado em ascensão, a aceitação de sucos tropicais no mercado internacional requer melhorias nas técnicas de processamento como, por exemplo, a inclusão da etapa de clarificação, já que, uma vez límpido, ele poderá ser matéria-prima de melhor qualidade, permitindo maior eficiência dos processos de concentração e evitando problemas de entupimento em trocadores de calor e incrustações em tubulações, que diminuem a troca térmica nos equipamentos.

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo de enzimas úteis na indústria de alimentos, amplamente utilizadas no processamento de polpa e sucos de frutas, pois agem sobre as substâncias pécticas, aumentando o rendimento e otimizando o processo de clarificação dos sucos.

Em escala industrial, as pectinases são produzidas principalmente por fungos filamentosos, com a composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos variando com o gênero, a espécie e com a linhagem de microrganismo utilizada. Portanto, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é fundamental para o seu uso industrial. As pesquisas que envolvem o estudo e a produção de enzimas com potencial industrial são importantes, visto a constante busca por novos produtos.

Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo geral de contribuir para o desenvolvimento de tecnologias enzimáticas para a indústria de alimentos pela obtenção de enzimas pectinolíticas, especialmente endo e exo-poligalacturonases, e sua aplicação na indústria de sucos, tendo como objetivos específicos:

- selecionar linhagens fúngicas aplicáveis à indústria de alimentos, obtidas por isolamento a partir de vegetais em decomposição, que se adaptem a processos de produção submersos e em estado sólido;
- analisar os extratos pectinolíticos obtidos quanto à presença de aflatoxinas, visando à sua aplicação em processos da indústria de alimentos;
- avaliar as poligalacturonases produzidas com respeito aos valores ótimos de

temperatura e pH de reação e quanto à estabilidade térmica;

- definir as concentrações do indutor (pectina) e da fonte de carbono (glicose) ideais para a produção das poligalacturonases em processos submerso e em estado sólido;
- verificar o efeito do pH inicial do meio sobre a produção das poligalacturonases em processo submerso;
- testar as preparações enzimáticas produzidas no tratamento de sucos de maçã e de mirtilo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são polissacarídeos de alto peso molecular, presentes em tecidos de vegetais superiores, sendo responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos e participando da organização estrutural que envolve os polissacarídeos componentes da parede celular, a celulose e a hemicelulose (Alkorta *et al*. 1998; Vries & Visser, 2001).

Os polissacarídeos pécticos são os polímeros mais complexos e abundantes na matriz celular vegetal (cerca de 1/3 da matriz), destacando-se pela grande quantidade entre a lamela média e a parede primária das células (Hoondal *et al*. 2002; Willats *et al*. 2006).

As substâncias pécticas são formadas por três frações principais: a fração linear conhecida como homogalacturonana (HG) e as frações ramificadas conhecidas como ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II). As homogalacturonanas (HG) são polímeros constituídos por longas cadeias de unidades de ácido galacturônico em ligação α-1,4 que podem estar parcialmente esterificadas, razão pela qual são mais resistentes à hidrólise. Unidades de ramnose podem ser encontradas, ocasionalmente, na homogalacturonana, como ilustrado na Figura 1 (Willats *et al*. 2006).

A ramnogalacturonana I (RG-I) é o segundo polissacarídeo mais importante das substâncias pécticas. Sua cadeia consiste da repetição de unidades de dissacarídeos de ácido galacturônico e ramnose, apresentando cadeias laterais formadas por diferentes açúcares, principalmente arabinanas e galactanas, ligados diretamente às unidades de ramnose em C4 (Carpita & Gibaut, 1993). A ramnogalacturonana II (RG-II) é um polissacarídeo péctico complexo formado por ácido galacturônico, ramnose e galactose (Vidal *et al*. 2000; Gulfi *et al*. 2007).

O tamanho das cadeias pode variar consideravelmente e a composição dos açúcares da RG-I pode ser altamente heterogênea. Em contraste, a RG-II possui estrutura altamente conservada, o que torna as substâncias pécticas polímeros extremamente complexos e estruturalmente diversos (Willats *et al*. 2006).

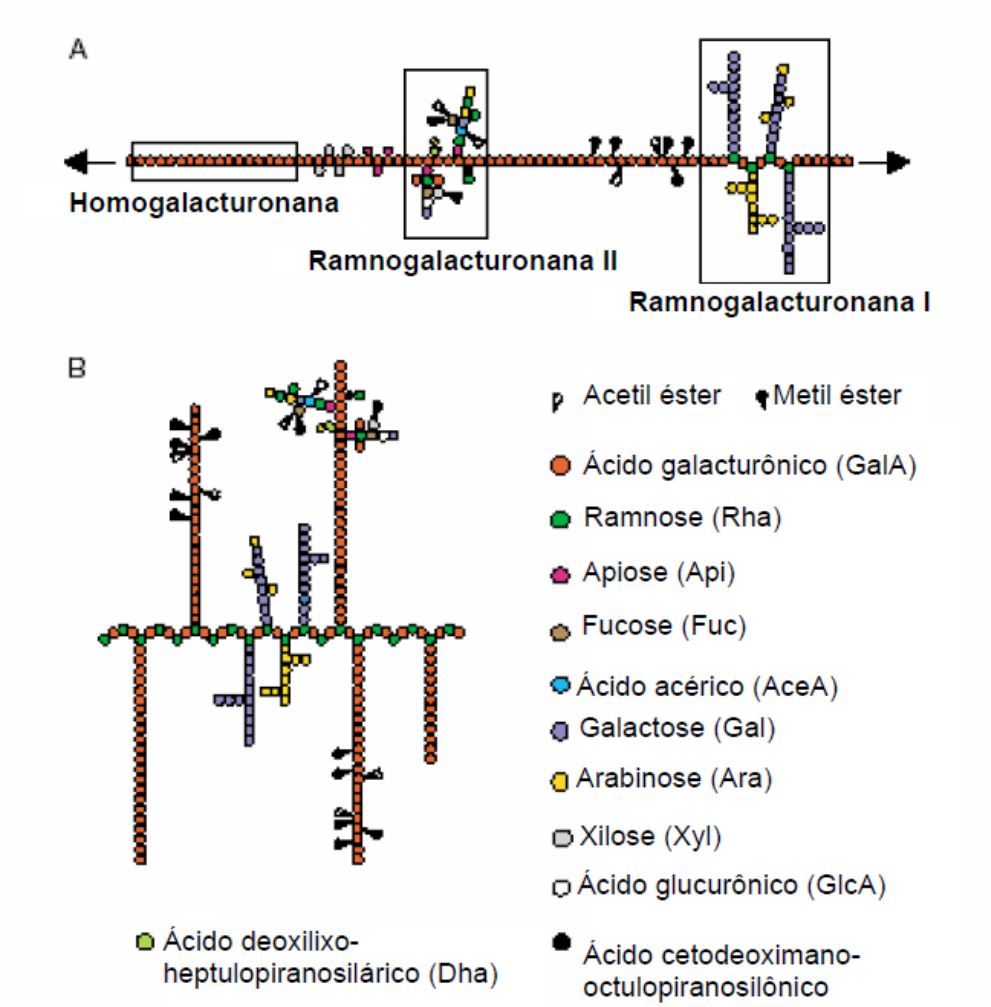


Figura 1. A estrutura básica da pectina. Representação esquemática convencional (A) e da estrutura recentemente proposta (B) para pectina (Willats *et al.* 2006).

Segundo a *American Chemical Society* as substâncias pécticas são classificadas em protopectinas, ácidos pectínicos, pectinas e ácido péctico (Alkorta *et al*. 1998).

As protopectinas, compostas por unidades de ácidos galacturônicos ligadas ao cálcio por ligações iônicas, são insolúveis em água e estão presentes nos tecidos vegetais intactos (Jayani *et al*. 2005).

Os ácidos pécticos são substâncias pécticas compostas de ácidos poligalacturônicos coloidais (Alkorta *et al*. 1998; Kashyap *et al*. 2001), onde os grupos carboxilas estão essencialmente não esterificados (Sakai *et al*. 1993; Kashyap *et al*. 2001). Os ácidos pectínicos são ácidos poligalacturônicos coloidais que possuem um número significativo de grupos metil (Alkorta *et al*. 1998; Sakai *et al*. 1993).

O termo geral "pectina" designa ácidos pectínicos solúveis em água, com

quantidade variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições determinadas (Sakai *et al*. 1993). As pectinas são polímeros nos quais pelo menos 75% dos grupos de galacturonatos estão esterificadas com metanol (Jayani *et al.* 2005).

2.2 Enzimas pectinolíticas

Pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, insetos, nematódeos e plantas (Gracheva & Krivova, 2000), a fim de degradar – para a obtenção de fonte de carbono, ou para modificar, fruto em amadurecimento – o heteropolissacarídeo pectina. Existe uma grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos de plantas, e dependendo de seu mecanismo de ação sobre essas substâncias, as enzimas pécticas são divididas em despolimerizantes e desmetoxilante. As enzimas despolimerizantes agem catalisando a quebra das ligações ∝-1,4 da cadeia principal do polissacarídeo péctico, enquanto a desmetoxilante desesterifica a pectina a ácido péctico por remoção dos resíduos metoxila (Pilnik & Rombouts, 1981; Kashyap *et al*. 2001).

De acordo com Kashyap *et al*. (2001), pectinases despolimerizantes são classificadas segundo os critérios:

- modo pelo qual a ligação é rompida (hidrólise ou trans-eliminação);
- posição de ataque no substrato (endopectinase ou exopectinase);
- tipo de substrato hidrolisado (ácido péctico ou pectina).

As enzimas incluídas no grupo das pectinases despolimerizantes são apresentadas em seguida (Kashyap *et al*. 2001; Jayani *et al*. 2005).

- **Poligalacturonases (PG)**
  - Endo-PG (EC 3.2.1.15): hidrolisa aleatoriamente as ligações ∝-1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico;
  - Exo-PG 1 (EC 3.2.1.67): hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não-redutora, liberando ácidos galacturônicos;

- Exo-PG 2 (E.C.3.2.1.82): hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico, a partir do terminal não-redutor, liberando ácidos digalacturônicos.

- **Polimetilgalacturonases (PMG)**
  - Endo-PMG (EC 3.2.1.15): hidrolisa a ligação glicosídica α-1,4 da pectina, preferencialmente, na pectina altamente esterificada;
  - Exo-PMG (EC 3.2.1.15): hidrolisa a ligação glicosídica α-1,4 da pectina na extremidade não redutora da cadeia da pectina.

- **Poligalacturonato Liase (PGL)**
  - Endo-PGL ou endo-pectato liase (E.C.4.2.2.2): hidrolisa as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido péctico por trans-eliminação;
  - Exo-PGL ou exo-pectato liase (E.C.4.2.2.9): hidrolisa as ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não-redutores

- **Polimetilgalacturonato liase (PMGL)**
  - Endo-PMGL ou endo-pectina liase (E.C.4.2.2.10): hidrolisa as ligações glicosídicas entre resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminaçã;
  - Exo-PMGL ou exo pectina liase: hidrolisa a pectina, sequencialmente, por trans-eliminação.

A classificação "enzima pectinolítica desmetoxilante" inclui apenas uma representante, a pectinesterase (PE) (E.C.3.1.1.11)**,** que catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, transformando-a em ácido péctico e liberando metanol. A PE, também denominada de pectina metil-esterase, está envolvida nas mudanças das substâncias pécticas de frutas e vegetais. Geralmente, a PE inicia o ataque ao substrato na posição adjacente ao grupo carboxila livre (Alkorta *et al*. 1998).

Na Tabela 1 são resumidas as principais enzimas pectinolíticas e seu mecanismo de ação (Kashyap *et al*. 2001; Jayani *et al*. 2005).

Quadro 1. Modo de ação das enzimas pectinolíticas (Adaptado de Jayani *et al*. 2005; Kashyap *et al*. 2001).

ENZIMAS	E. C. nº	MECANISMO DE AÇÃO
DESMETOXILANTES		
Pectina metil-esterase (PE)	3.1.1.11	Catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina
DESPOLIMERANTES		
Hidrolases		
Poligalacturonase (PG)		
1-Endo-PG	3.2.1.15	Hidrolisa aleatoriamente as ligações α-1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico
2-Exo-PG 1	3.2.1.67	Hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não-redutora.
3-Exo–PG 2	3.2.1.82	Hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não-redutora.
Polimetilgalacturonases (PMG)		
1-Endo-PMG		Hidrolisa a pectina aleatoriamente
2-Exo-PMG		Hidrolisa a pectina a partir da extremidade não-redutora
Liases		
Polimetilgalacturonato liase (PMGL)		
1-Endo – PMGL ou endo-pectina liase	4.2.2.10	Rompe as ligações glicosídicas entre resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação.
2-Exo – PMGL ou exo pectina liase		Causa a quebra da pectina, a partir da extremidade não-redutora, por trans-eliminação.
Poligalacturonato liase (PGL)		
1-Endo – PGL ou endo-pectato liase	4.2.2.2	Rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido péctico por trans-eliminação.
2-Exo – PGL ou exo-pectato liase	4.2.2.9	Rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não-redutores.

2.3 Produção de pectinases microbianas

De um modo geral, os processos de produção de enzimas envolvem as etapas de seleção de microrganismos e de definição das condições de processo, da composição do meio de cultivo, dos sistemas de esterilização, inoculação e do regime de condução do processo fermentativo, bem como dos tratamentos finais de concentração e purificação (Comissão Européia, 2002). Contudo, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (Bravo *et al*. 2000). Nos itens seguintes, é detalhada a produção de pectinases microbianas.

2.3.1 Seleção de microrganismos produtores

Para a seleção de microrganismos pectinolíticos, as fontes normalmente utilizadas são vegetais deteriorados e resíduos agrícolas. A etapa de seleção de linhagens pode ser realizada por métodos microbiológicos tradicionais de isolamento em meios enriquecidos, após avaliar-se a atividade enzimática em testes de difusão da enzima diretamente em placas contendo um meio seletivo (Chang *et al*. 1995; Ferñandes-Salomão *et al*. 1996).

A visualização do halo decorrente da degradação da pectina em meio sólido é um dos métodos de verificação preliminar da capacidade pectinolítica do microrganismo isolado (McKay, 1988; Oliveira *et al*. 2006). Posteriormente, para a avaliação da capacidade produtora da enzima, realizam-se testes em caldo de crescimento com a cepa isolada. Entretanto, até o momento em que a cepa não seja devidamente identificada, deve-se ter cuidado na manipulação, pois esta pode apresentar características patogênicas ou produção de toxinas (Da Silva *et al*. 1997).

Diferentes bactérias, leveduras e fungos filamentosos já foram isolados e identificados como bons produtores de enzimas pectinolíticas. Geralda-Silva *et al*. (2005) estudaram a capacidade pectinolítica de leveduras isoladas de frutas tropicais, selecionando uma cepa de *Candida krusei*. Lorentz (2005) isolou 55 linhagens bacterianas de *Paenibacillus* spp, dois quais 17 apresentaram atividade pectinolítica. Souza *et al*. (2003), quando analisaram 46 isolados de fungos filamentosos, encontraram 41,30% de isolados de *Aspergillus* entre os produtores de pectinases. Couri & Farias (1987) isolaram 49 isolados de fungos filamentosos de fontes naturais e selecionaram *A. niger* van Tieghem, da pimenta do reino, para produção de enzimas pectinolíticas por cultivo semi-sólido.

Apesar dos vários estudos que mostram a potencialidade de diferentes tipos de organismos como produtores de enzimas degradantes de substâncias pécticas, as preparações enzimáticas usadas na indústria de alimentos são de origem fúngica, visto que os fungos filamentosos são potentes produtores de enzimas pectinolíticas, além de que cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (Blandino *et al.* 2001; Bravo *et al*. 2000).

Os fungos filamentosos são microrganismos com estruturas morfologicamente complexas, exibindo diferentes formas estruturais ao longo do seu ciclo de vida. Sua estrutura é determinada não só pelo material genético da espécie, mas também por fatores químicos (componentes do meio) e físicos (temperatura, pH, forças mecânicas) e as condições de cultivo (Kossen, 2000).

Entre as espécies de fungos filamentosos se destacam as do gênero *Aspergillus*, que é constituído por um grande número de espécies (Vries & Visser, 2001). São contaminantes comuns de regiões tropicais e subtropicais, isoladas comumente do solo, de plantas em decomposição e do ar, predominando entre os demais fungos. A população de fungos pode variar de ano para ano e de local para local, por motivo de sobrevivência dos propágulos e das condições físico-químicas do substrato (Rossetto *et al*. 2003). As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (Wainwright, 1995).

O gênero *Aspergillus* exibe como característica elevada atividade do complexo pectinolítico (Gracheva & Krivova, 2000; Teixeira *et al*. 2000): *A. japonicus* 586 (Teixeira *et al*. 2000), *A. awamori* (Blandino *et al*. 2002), *A. nidulans* (Maccabe *et al*. 2002), *A. oryzae* (Malvessi & Silveira, 2004), *A. niger* (Fontana *et al*. 2005) e *A. sojae* (Tari *et al*. 2008) têm sido utilizados na produção de enzimas pectinolíticas.

Dentre as espécies de *Aspergillus* destacam-se os *Aspergillus* pretos - como *A. niger, A. tubingensis, A. foetidus, A. carbonarius, A. japonicus, A. aculeatus, A. heteromorphus* e *A. ellipticus* – por possuírem várias características que os tornaram organismos ideais para aplicações industriais, como a boa capacidade de crescimento e elevados níveis de secreção de enzimas (Davies, 1994).

As preparações comerciais de enzimas pectinolíticas utilizadas na indústria de alimentos são, geralmente, derivadas de fontes fúngicas de *A. niger*. Produtos obtidos com esta espécie têm a vantagem de possuir a classificação GRAS (*generally recognized as safe*) do FDA (*Food and Drugs Administration*), o que permite o uso de seus metabólitos na produção de alimentos (Vries & Visser, 2001).

No Brasil, de acordo com resolução – RDC n° 205, de 14 de novembro de 2006, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que aprova o regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano, *A. niger* é o principal microrganismo produtor de enzimas pectinolíticas. (ANVISA, 2006).

2.3.2 Produção de pectinases em cultivo submerso e em estado sólido

Existem dois tipos de processos que são utilizados para a produção de enzimas: cultivo submerso ou fermentação submersa (FSm) e cultivo em estado sólido ou

fermentação em estado sólido (FES) (Couto & Sanromán, 2006, Hoondal *et al*. 2002, Jayani *et al*. 2005). Os processos submersos apresentam variáveis na forma de condução que os classifica em processos: descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (Schmidell & Facciotti, 2001).

Diversos autores, em suas revisões sobre os processos fermentativos (FSm e FES), apresentam vantagens e desvantagens para cada tipo de processo. No entanto, é uma tarefa difícil generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido, sabendo-se que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes. Entretanto, algumas características particulares de cada processo podem ser destacadas. Segundo Mitchel *et al*. (2000) a principal diferença entre o cultivo submerso e em estado sólido diz respeito a quantidade de água livre presente no substrato. Cannel & Moo-Young (1980) relatam ainda que devido à ausência de água livre os cultivos em estado sólido, operam com menores volumes, não exigindo a remoção de grandes volumes de água para a concentração do produto e o baixo grau de umidade torna o ambiente inapropriado para muitos microrganismos potencialmente contaminantes.

Murthy *et al*. (1993) descrevem que a diferença entre os dois tipos de bioprocesso se refere à utilização, no cultivo em estado sólido, de substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário do cultivo submerso, onde se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Gervais & Molin (2003) relatam que a principal diferença entre os dois processos está na capacidade de mistura dos sistemas. Os cultivos submersos são reações de mistura perfeita, onde cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos. No entanto, nos cultivos em estado sólido, encontram-se sistemas com alta viscosidade, sendo que, para se chegar a uma homogeneidade, seria necessária uma excessiva agitação, o que poderia levar à ruptura celular. Assim, os autores concluem que os sistemas de cultivo em estado sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto.

O processo em estado sólido apresenta algumas limitações, que devem ser consideradas. Neste contexto, destaca-se que, em operações de grande escala, o calor gerado pelo metabolismo microbiano deve ser removido, o que se torna mais difícil no cultivo sólido, contrariamente ao que ocorre em cultivo submerso, pois a grande quantidade de água presente no meio facilita o controle da temperatura (Lonsane *et al*. 1991; Murthy *et al*. 1993). Além disto, a heterogeneidade da mistura no cultivo em estado

sólido dificulta o controle do crescimento microbiano e de parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos, dificultando sobremaneira o controle e a automatização do processo (Gervais & Molin, 2003; Pandey, 2003).

A grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida em sistema submerso, utilizando geralmente microrganismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção destas enzimas por este sistema é alto e o processo torna-se, muitas vezes, economicamente inviável (Pandey *et al*. 2000).

Entre os fatores que afetam a produção de pectinases, destacam-se os componentes do meio de crescimento, particularmente a fonte de carbono (tipo e concentração) e a presença de indutores (pectina e derivados) (Blandino *et al*. 2001), além de condições de processo como o suprimento de oxigênio, o pH, a temperatura e o teor de inóculo (Bravo *et al*. 2000).

Em geral, as pectinases são enzimas induzidas, o que torna necessário a suplementação do meio de cultura com pectina ou matérias ricas em pectina, tais como bagaço de cana-de-açúcar, maçã ou cascas de frutos cítricos (Silva *et al*. 2002; 2004; Blandino *et al*. 2001; Zheng & Shetty, 2000; De Gregório *et al*. 2002; Soccol & Vandenberghe, 2003). Estes substratos podem ser aproveitados com êxito, desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (Bravo *et al*. 2000; Blandino *et al*. 2001)

Fontana *et al*. (2005) relatam que a pectina pode ser usada por *A. niger* em cultivo em estado sólido, como substrato para o crescimento e indutor na produção de poligalacturonase. Maldonado & Strasser de Saad (1988), também verificaram o crescimento miceliar e produção de pectinase por *A. niger* usando exclusivamente pectina como fonte de carbono.

Bailey & Pessa (1990), em estudo sobre a produção de poligalacturonases por *A. niger* em cultivo submerso, observaram que a temperatura ótima para a produção dessas enzimas depende da composição do meio de cultivo. Segundo Fawole & Odunfa (2003), a produção de pectinases por *A. niger* é fortemente afetada pela temperatura.

Ueda *et al*. (1982) avaliaram a influência do pH na produção e composição do complexo pectinolítico sintetizado por *A. oryzae* A-3. Os autores observaram que cultivos fúngicos com pH controlado ou não resultam na formação de diferentes complexos pectinolíticos e as variações da atividade em função do pH do meio de cultivo podem estar relacionadas ao perfil da curva de estabilidade com o pH que cada enzima apresenta.

Acuña-Arguelles *et al*. (1995) relatam distintas respostas fisiológicas com a mesma linhagem de *A. niger*, de acordo com a técnica de fermentação utilizada, mostrando vantagens na produção de pectinases em estado sólido sobre o processo submerso.

Ueda *et al*. (1982) avaliaram a influência do pH na produção e composição do complexo pectinolítico sintetizado por *A. oryzae* A-3. Os autores observaram que cultivos fúngicos com pH controlado ou não resultam na formação de diferentes complexos pectinolíticos e as variações da atividade em função do pH do meio de cultivo podem estar relacionadas ao perfil da curva de estabilidade com o pH que cada enzima apresenta.

Acuña-Arguelles *et al*. (1995) relatam distintas respostas fisiológicas com a mesma linhagem de *A. niger*, de acordo com a técnica de fermentação utilizada, mostrando vantagens na produção de pectinases em estado sólido sobre o processo submerso.

2.4 Análise micotoxicológica das preparações enzimáticas

De acordo com a resolução, RDC n° 205/2006 da ANVISA, as enzimas de origem microbiana devem ser obtidas por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e impeçam a introdução de microrganismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis, sendo os processos de obtenção rigorosamente controlados. As células vegetais e os meios de culturas para os microrganismos não devem transferir contaminantes ao produto acabado em níveis que possam torná-lo nocivo à saúde, assim como não devem ser utilizados microrganismos patogênicos para os seres humanos na produção destas enzimas (ANVISA, 2006).

Ao isolarem-se fungos filamentosos de tecidos vegetais em decomposição, podem-se selecionar linhagens capazes de produzir micotoxinas, pois muitos fungos produtores de toxinas estão envolvidos na contaminação de produtos agrícolas (Ellis *et al.* 1991).

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por várias espécies de fungos. Esses microrganismos, sob condições favoráveis, podem se desenvolver sobre diversos substratos (entre os quais os alimentos) e produzir toxinas (Galvano *et al.* 2001). Desta forma, algumas espécies produtoras de enzimas pectinolíticas podem, eventualmente, produzir metabolitos tóxicos como as aflatoxinas e outras micotoxinas.

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde estabelece o limite de tolerância de 30ppb (trinta partes por bilhão) para as aflatoxinas, calculada pela soma dos

conteúdos das aflatoxinas B1 e G1(ANVISA, 1976) para todos os alimentos, exceto para leite, amendoim e milho.

As aflatoxinas (di-hidrofurano cumarinas) são, sem dúvida, as micotoxinas que despertam maior interesse pela comunidade científica. São altamente teratogênicos, mutagênicos e com propriedades cancerígenas (Atanda *et al*. 2005; Bunger *et al*. 2004).

Aflatoxinas são produzidas especialmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus.* São conhecidos dezoito compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B_1 (AFB_1), B_2 (AFB_2), G_1 (AFG_1) e G_2 (AFG_2) (Williams *et al.* 2004).

2.5 Aplicações das pectinases no processamento de alimentos

As pectinases possuem grande destaque na indústria de alimentos, atuando principalmente na maceração dos tecidos vegetais (Lea, 1998; Pilnik & Voragen, 1993). Também são utilizadas na fabricação de vinho, na extração de óleos vegetais, na fermentação do café, do cacau e do fumo, na fabricação de alimentos infantis, e de ração animal (Kashyap *et al*. 2001; Gummadi & Panda, 2003). Para a extração e clarificação de sucos e vinhos têm sido utilizadas pectinases ácidas enquanto que para o tratamento de vegetais, em outros ramos da indústria alimentícia, utilizam-se pectinases alcalinas (Hoondal *et al*. 2002).

A extração de sucos é feita, habitualmente, por prensagem mecânica que provoca o rompimento das paredes celulares das células do mesocarpo levando à liberação do suco. Frutas ricas em pectina geram sucos com alta viscosidade e turbidez, uma vez que os mesmos arrastam resíduos de pectina e outros polissacarídeos de parede (Lea, 1998). A adição de pectinases e outras enzimas despolimerizantes hidrolisam esses compostos e promovem a redução da viscosidade aumentando a vida de prateleira dos produtos (Bhat, 2000; Cardoso *et al*. 1999; Kaur *et al*. 2004).

Alguns tipos de suco apresentam acentuada turbidez que nem sempre é eliminada com a centrifugação, visto que, mesmo após esse processo, pequenas partículas contendo pectina podem manter-se em suspensão. Nesses casos, a despectinização degrada as pectinas solúveis que geram a viscosidade e que causam agregação de partículas responsáveis pela turbidez (complexo pectina-proteína). A Figura 2 ilustra como o fenômeno ocorre (Lea, 1998; Pilnik & Voragen, 1993).

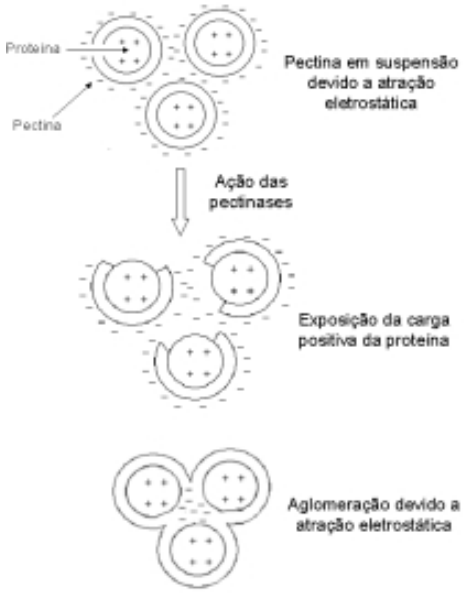


Figura 2. Mecanismo de formação do complexo pectina-proteína (Lea, 1998).

Em um ambiente ácido, as moléculas de pectina estão carregadas negativamente, causando o efeito de repulsão entre as partículas de mesma carga, que ficam suspensas. Estas "partículas turvas", como são conhecidas, são responsáveis pela turbidez do suco. As pectinases atuam degradando a pectina e expondo a parte carregada positivamente da proteína. A repulsão eletrostática entre essas partículas é então reduzida, permitindo que elas formem aglomerados que precipitam (Lea, 1998; Pilnik & Voragen, 1993).

Diversos estudos também vêm sendo conduzidos com a adição de enzimas pectinolíticas na etapa de extração dos sucos de frutas. São exemplos deste tipo de aplicação das pectinases os trabalhos de Mutlu *et al*. (1999), na produção de suco de cenoura, de Bastos *et al*. (2002), na extração da polpa de cupuaçu, e Granada *et al*. (2001), na obtenção de sucos de amora-preta. De acordo com Granada *et al.* (2001), em frutos como amora, morango, cereja e ameixa, o suco está retido dentro da estrutura celular e as preparações enzimáticas promovem a quebra desta estrutura, dissolvendo os compostos pectinolíticos, e consequentemente liberando mais facilmente o suco.

Outros compostos internos da célula vegetal têm aumentado seus teores nos sucos extraídos com o auxílio de pectinases. Incluem-se entre estes os compostos fenólicos, que conferem coloração, sabor e aroma, e os sólidos solúveis, aumentando assim os teores de açúcares e de ácidos (Bastos *et al.* 2002; Granada *et al*. 2001; Nogueira *et al*. 2003).

Na obtenção do suco de uva e na fabricação de vinho, a adição de pectinases é requerida em diferentes etapas. Durante o esmagamento das uvas, melhora as

características visuais (cor e turbidez), devido à maior liberação de antocianinas de uvas vermelhas para o suco, e aumenta o rendimento da extração do suco (Jayani *et al*. 2005; Pilnik & Voragen, 1993). O tratamento do suco com enzimas pectinolíticas, antes ou durante a fermentação, retira muitas partículas suspensas e, frequentemente, alguns microrganismos indesejados. Finalmente, a adição de enzimas pécticas ao vinho fermentado no último estágio aumenta a velocidade de filtração e de clarificação (Pilnik & Voragen, 1993).

A aplicação de enzimas pectinolíticas na indústria de sucos cítricos dá-se, principalmente, no tratamento da polpa residual (*pulp wash*) com o objetivo de extrair o máximo possível de sólidos solúveis (Silva *et al*. 1999). Contudo, em sucos não clarificados como o de laranja, as pectinases podem ser usadas em diferentes estágios, permitindo uma melhor extração de açúcares e sólidos solúveis, resultando em maior rendimento e viscosidade mais baixa (Pilnik & Voragen, 1993).

Diversos estudos reforçam a utilização de pectinases em combinação com outras hidrolases na indústria de alimentos. A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, é usada na extração e na clarificação de sucos de frutas e vegetais (Kaur *et al*. 2004; Gailing *et al*. 2000). Barros *et al.* (2004) reduziram em 22% e 30% a viscosidade de sucos de abacaxi e cereja, respectivamente, com a utilização de uma mistura de pectinases, celulases e hemicelulases. De acordo com Demir *et al*. (2001), o efeito sinérgico da combinação de pectinases e celulases é crucial no tratamento enzimático de muitas polpas de frutas.

As pectinases, juntamente com outras enzimas hidrolíticas como as celulases e as xilanases, vêm sendo estudadas visando à sua aplicação na extração de óleos essenciais e pigmentos de materiais vegetais (Coelho *et al*. 1995). Pedruzzi *et al*. (2001) obtiveram bons resultados na extração de óleos essenciais de *Citrus latipholia* (limão Taiti) utilizando pectinases, juntamente com celulases.

Pectinases, em conjunto com β-glucanases e hemicelulases, têm sido utilizadas na produção de vinho. O uso combinado destas enzimas proporciona uma maior eficiência na maceração da casca com o aumento da extração de pigmentos, facilitando a clarificação e a filtração do mosto e aumentando a qualidade e a estabilidade do vinho (Alkorta *et al*. 1998; Férnandez *et al*. 2000; Takayanagi *et al*. 2001).

Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulases e hemicelulases são utilizadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração, o fracionamento na centrifugação e a produção de azeite com baixo teor de

umidade. Outra vantagem atribuída ao uso de enzimas durante a etapa de maceração é o aumento da quantidade de agentes antioxidantes, como a vitamina E, o que reduz a indução ao ranço (Alkorta *et al*. 1998; Kashyap *et al*. 2001). Hadj-Taieb *et al*. (2006) obtiveram um aumento de 10% no rendimento de azeite de oliva em escala industrial quando empregaram enzimas pectinolíticas no processo.

Pectinases são importantes na fermentação de café e chá, pois aceleram o processo de fermentação, melhorando a qualidade do produto final (Kashyap *et al*. 2001; Silva *et al*. 2000). Enzimas pectinolíticas são adicionadas para remover a camada de mucilagem do grão, constituída de três quartos de substâncias pécticas. Celulases e hemicelulases, presentes em preparações comerciais, são aspergidas nos grãos, acelerando o processo de fermentação (Jayani *et al*. 2005; Kashyap *et al*. 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Neste trabalho, foram utilizadas como referência as linhagens produtoras *Aspergillus oryzae* IPT 301 (Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo, Brasil) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (Universidad de Salta, Argentina), para cultivos submersos (FSm) (Fontana *et al.* 2009) e em estado sólido (FES) (Fontana *et al*. 2005), respectivamente.

Avaliaram-se 60 isolados fúngicos obtidos dos seguintes vegetais em decomposição: abacate (3 isolados), amora (1 isolado), banana (3 isolados), batata-doce (1 isolado), brócolis (1 isolado), bergamota (11 isolados), café (2 isolados), cebola (1 isolado) cenoura (2 isolados), chuchu (1 isolado), couve roxo (1 isolado), couve-flor (2 isolados), doce de figo (1 isolado), goiaba (7 isolados), limão (3 isolados), maçã (3 isolados), mamão (2 isolados), mamão papaia (1 isolado) tomate (1 isolado), manga verde (1 isolado), maracujá (1 isolado), melão (3 isolados), morango (2 isolados), pepino (1 isolado), pêra (1 isolado), romã (2 isolados), tomate (1 isolado), uva passa (1 isolado). Além destes, foi incluído nos testes o isolado fúngico 39J, obtido de mamão em decomposição em trabalho anterior (Andreazza *et al*. 1999).

A manutenção dos microrganismos foi feita a 4ºC, após cultivo a 30°C em meio de conservação sólido (MC) até completa esporulação. Essa condição de cultivo também foi utilizada para o preparo dos inóculos nos diferentes cultivos descritos nesse trabalho.

3.2 Meios de cultivo

O meio de conservação sólido (MC), descrito por Maiorano (1982), tem a seguinte formulação (g/L): glicerina, 25; glicose, 25; extrato de levedura, 5; agar-agar, 20. Antes da solidificação, o pH do meio foi corrigido para 6,5 com NaOH 1 M. Após autoclavado a 1 atm por 20 minutos, aproximadamente 20 mL desse meio foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas em estufa seca, a 170°C, por 3 horas.

O meio para identificação dos microrganismos pectinolíticos (MP), descrito por

Hankin & Anagnostakis (1975), tem a seguinte composição (g/L): pectina cítrica (CP KELCO S.A, Brasil), 1,0; extrato de levedura, 0,05; agar-agar,1,5; Triton X 100, 0,1; $(NH_4)_2SO_4$, 1 x 10^{-3}; KH_2PO_4, 2 x 10^{-3}; $FeSO_4.7H_2O$, 1 x 10^{-4}; Na_2HPO_4, 3 x 10^{-3}. Antes da solidificação, o pH do meio foi corrigido para 6,5 com NaOH 1 M ou H_2SO_4 1,5 M. Após autoclavado a 1 atm por 20 minutos, aproximadamente 20 mL desse meio foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas em estufa, a 170°C, por 3 horas.

O meio de produção de poligalacturonases em cultivos em estado sólido (WS), descrito por Fontana *et al*. (2005), tem a seguinte composição (% m/m): farelo de trigo (MOINHO NORDESTE, Brasil), 36,6; pectina cítrica (CP KELCO S.A, Brasil), 6,0; glicose,10; $(NH_4)_2SO_4$, 4; KH_2PO_4, 2; $MgSO_4$, 1; $FeSO_4.7H_2O$, 6,3 x 10^{-5}; $ZnSO_4$, 6,2 x 10^{-5}; $MnSO_4$, 1,0 x 10^{-6} . A este meio foi adicionada água para obter-se umidade de 63% m/m. O meio foi autoclavado a 1 atm por 20 minutos.

Este meio de produção serviu como base para avaliar diferentes concentrações de pectina cítrica (0, 2, 6, 10, 12, 16, 20 e 25% m/m), mantendo-se constante a concentração de glicose (10% m/m). Para avaliar diferentes concentrações de glicose (0, 5, 10, 15 e 20% m/m), como fonte de carbono, foi fixada a concentração de pectina cítrica em 6% (m/m). O pH dos meios foi ajustado em 4,0 utilizando NaOH 1 M ou H_2SO_4 1,5 M e autoclavados a 1 atm 20 minutos. As condições avaliadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de glicose e pectina avaliadas no cultivo em estado sólido.

	Glicose (g/100g)	**Pectina (g/100g)**
P0	10	0
P2	10	2
P6	10	6
P12	10	12
P16	10	16
P20	10	20
P25	10	25
G0	0	6
G5	5	6
G10	10	6
G15	15	6
G20	20	6

O meio de produção das poligalacturonases dos cultivos submersos (WB) definido por Maiorano (1990) é composto por (g/L): farelo de trigo (MOINHO NORDESTE, Brasil), 40; pectina cítrica (CP KELCO S.A, Brasil), 20; extrato de levedura, 0,05;

$(NH_4)_2SO_4$, 5,0; KH_2PO_4, 2,5; $MgSO_4$, 0,5; $FeSO_4.7H_2O$, 6,3 x 10^{-4}; $ZnSO_4$, 6,2 x 10^{-4}; $MnSO_4$, 1,0 x 10^{-5} . O meio foi autoclavado a 1atm por 20 minutos.

O meio WB serviu como base para a definição da formulação isenta de sólidos em suspensão, no qual o qual o farelo de trigo foi substituído por seu extrato aquoso. Para a obtenção do extrato de farelo de trigo, uma massa de 80 g de farelo integral foi triturada em moinho, selecionada em peneira de classificação de 10 mesh, misturada com 500 mL de água destilada, sendo a mistura autoclavada a 1 atm por 15 minutos. Após resfriamento, a mistura foi filtrada e o extrato utilizado na preparação do meio isento de sólidos em suspensão (WBE). Este meio tem a seguinte composição (g/L): extrato de farelo de trigo (Moinho NORDESTE, Brasil), 80; pectina cítrica (CP KELCO S.A, Brasil), 20; glicose, 20; peptona, 13; extrato de levedura,0,05; $(NH_4)_2SO_4$, 5,0; KH_2PO_4, 2,5; $MgSO_4$, 0,5; $FeSO_4.7H_2O$, 6,3 x 10^{-4}; $ZnSO_4$, 6,2 x 10^{-4}; $MnSO_4$, 1,0 x 10^{-5} (Fontana *et al.* 2009). O meio foi autoclavado a 1 atm por 20 minutos.

A partir do meio WBE, diferentes formulações foram testadas, conforme é descrito na Tabela 2. Avaliaram-se meios com diferentes concentrações de glicose (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g/L), pectina (0, 5, 10, 15 e 20 g/L) e diferentes valores de pH iniciais do meio (3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0). O pH dos meios foi ajustado para 4,0 utilizando NaOH 1 M ou H_2SO_4 1,5 M para os ensaios com diferentes concentrações de glicose e pectina, ou de acordo com o pH inicial do meio, para os ensaios com diferentes valores de pH iniciais. Os meios foram autoclavados a 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, avaliaram-se as melhores condições em fermentador de bancada. Nestes ensaios, os valores de pH foram controlados das seguintes formas: pH inicial 3,0 e sem controle durante o processo (F1); pH inicial 4,0 e sem controle durante o processo (F2); pH inicial 4,0, com valor mínimo sem controle e, após, com o máximo controlado em 3,5 (F3). Os três ensaios foram conduzidos em meio WBE com 20 g/L de pectina e 0 g/L de glicose. O pH dos meio foi controlado utilizando-se NaOH 3 M.

Tabela 2. Diferentes concentrações de glicose, pectina e valores de pH inicial do meio de cultivo submerso.

	Glicose (g/L)	Pectina (g/L)	pH inicial
G0	0	20	4
G5	5	20	4
G10	10	20	4
G15	15	20	4
G20	20	20	4
G25	25	20	4
G30	30	20	4
P0	0	0	4
P5	0	5	4
P10	0	10	4
P15	0	15	4
P20	0	20	4
P20	0	20	4
pH3	0	20	3
pH4	0	20	4
pH5	0	20	5
pH6	0	20	6
pH7	0	20	7

3.3 Isolamento de cepas obtidas de frutas e vegetais em decomposição

O isolamento das cepas foi realizado pelo método de estrias em superfície de meio sólido em placas de Petri conforme descrito por Hankin & Anagnostakis (1975). Após o crescimento dos isolados no meio MC, conídios foram coletados para formar uma suspensão de 10^6 conídios/mL. Um volume de 7 µL foram inoculados, em placa de Petri, contendo o meio MP (meio de identificação) e incubados a 28°C.

Decorrido o período de incubação, as placas receberam 2,0 mL da solução de CTAB 10 g/L (brometo de cetil-trimetil-amônio) e as colônias foram comparadas conforme a formação de halo resultante da secreção de pectinases que degrada a pectina presente no meio. A revelação e visualização do halo são decorrentes da insolubilização da pectina por CTAB.

Foi calculada, então, a relação entre os diâmetros da colônia e do halo formado, sendo definida como 2,0 a relação H/C utilizada para a escolha dos isolados a serem utilizados na sequencia dos estudos.

3.4 Identificação dos isolados fúngicos selecionados

A identificação dos isolados 23 e 39J foi realizada na Fundação André Tosello (Campinas, Brasil), através de taxonomia convencional, baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados citados na literatura de referência.

3.5 Detecção de aflatoxinas

Para detecção das aflatoxinas, um fragmento de cultura pura das linhagens isoladas foi semeado, centralmente, na superfície do meio MC, seguindo-se de incubação, a 25°C, por 3 dias. Foi adicionado 0,2 mL solução de sulfato de amônio 25% (m/v), às colônias, mantendo-se a placa de Petri invertida. O resultado positivo foi observado pela intensificação da coloração rosa no verso da colônia (Saito & Machida, 1999).

As concentrações de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) dos extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens selecionadas foram determinadas através do ensaio imunoenzimático que emprega anticorpos monoclonais - ELISA (Neogen) (Newsome, 1986), pelo Laboratório ALAC (Garibaldi, Brasil).

3.6 Condições experimentais

No preparo do inóculo foi utilizado o método descrito por Linde (2000), em que os conídios foram contados em câmara de Neubauer. Para os meios de cultivo em FES, foi adicionada uma suspensão de conídios com uma concentração inicial de 10^7 conídios/100 gramas de meio sólido e para os cultivos líquidos**,** 10^5 conídios/100 mL de meio líquido.

No cultivo submerso (FSm), para a seleção das linhagens pectinolíticas e avaliação da influência de diferentes concentrações de glicose, pectina e valores de pH iniciais do meio, foi utilizado o procedimento descrito por Malvessi & Silveira (2004). Foram realizados, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 500 mL com gargalo alongado, contendo 100 mL de meio, cobertos com uma fina manta de algodão e gaze, a 28ºC e em agitador recíproco a 300 rpm (B. BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT, Alemanha) por 96 horas.

Foram realizados, ainda, ensaios em fermentador de bancada (B. BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT®B, Alemanha), com volume útil de 5 litros e volume de trabalho entre 3,2 e 4,1 L. A cuba de fermentação, em vidro refratário, possui parede dupla e tampa de aço inoxidável. À tampa, é acoplado um conjunto de quatro chicanas com 10 mm de largura por 204 mm de comprimento, disposto num diâmetro de 154 mm, e distanciado do tampo em 96 mm. A agitação é proporcionada por três turbinas de 60 mm de diâmetro, com seis lâminas planas, separadas a uma distância de 37 mm. A dispersão do ar é feita a partir de um anel perfurado instalado abaixo da extremidade do eixo central do agitador, a 20 mm do fundo da cuba. Durante os cultivos, a frequência dos agitadores foi variada entre 300 e 800 rpm e a vazão específica de ar entre 0,5 e 2,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto).

Os cultivos em estado sólido (FES) foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Fontana *et al.* (2005). Foram utilizados, inicialmente, frascos Becher de 800 mL contendo 100 g de meio WS. Os frascos Becher contendo o meio foram esterilizados e, após a reposição da água perdida por evaporação, foram inoculados e cobertos com uma camada fina de gaze esterilizada. As incubações foram feitas em estufa a 30°C em atmosfera saturada em umidade por 120 horas. Para a seleção das linhagens fúngicas e os ensaios com diferentes concentrações de glicose e pectina, foram utilizados frascos Becher de 50 mL com 12 g de meio por 72 horas.

3.6.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

Em FSm, os extratos enzimáticos foram obtidos por centrifugação das amostras a 10.000 rpm (B. BRAUN BIOTECH modelo SIGMA 1-13, Alemanha), por 10 minutos, sendo os sobrenadantes armazenados a 4°C para posterior análise. Em FES, os extratos enzimáticos foram obtidos com a mistura de 20 mL de água pH 4,0 com 2,7 g de meio, sendo a mistura mantida por 30 minutos sob agitação em agitador recíproco a 200 rpm (B. BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT, Alemanha) e temperatura de 28°C. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm (B. BRAUN BIOTECH modelo SIGMA 1-13, Alemanha), por 10 minutos, e armazenada a 4°C para posterior análise.

3.6.2 Caracterização das preparações enzimáticas

As endo e exo-poligalacturonases foram avaliadas com respeito à temperatura e ao pH de reação. Para determinar-se a temperatura ideal de reação foram realizados ensaios de atividade na faixa de 20 a 80°C, fixando-se as demais condições padronizadas para análise.

O pH ideal de reação foi avaliado utilizando-se soluções tampão comerciais (LAFAN QUÍMICA FINA LTDA, Brasil) de biftalato de potássio (pH 3,0, 4,0 e 5,0) e fosfato de potássio (pH 6,0 e 7,0), fixando-se as demais condições padronizadas para análise.

Avaliou-se, ainda, a estabilidade das poligalacturonases produzidas frente a diferentes temperaturas de incubação dos extratos brutos (20, 30, 40, 50, 60 e 70ºC), em diferentes tempos de incubação (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos).

3.6.3 Tratamento enzimático de sucos de frutas

Nos testes de tratamento enzimático, foram estudados dois tipos de sucos, um suco claro (suco de maçã) e um suco escuro (suco de mirtilo). Para obtenção dos sucos, as frutas foram selecionadas quanto à sanidade e higienizadas em três estágios de imersão: (1) imersão: água clorada com concentração de 100 ppm por 20 minutos; (2) imersão: água clorada com concentração de 50 ppm por 10 minutos e (3) imersão: água corrente. Após a drenagem do excesso de água, foram processadas para obtenção dos sucos. O suco de maçã (*Malus domestica*) da cultivar (cv) Gala foi obtido por centrifugação, em centrífuga doméstica (WALITA, Brasil). O suco de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) cv Bluegem e Clímax foi obtido por liquefação da fruta em um liquidificador industrial (METVISA, Brasil) e posteriormente filtrado em peneira de 10 mesh.

No tratamento enzimático foram testados extratos obtidos nos ensaios de fermentação com *A. niger* T0005007-2 (TE1) em FES, *A. oryzae* IPT 301 (TE2) em FSm, *A. niger* LB23 (TE3) em FES e *A. fumitatus* LB39J (TE4) em FSm. Como referências foram utilizadas duas preparações enzimáticas comerciais (NOVOZYMES LATIN AMERICA LTDA, Brasil) recomendadas e cedidas pela LNF (Brasil): Pectinex®BE Colour (PB), para o suco de mirtilo, e Pectinex®Clear (PC), para o suco de maçã.

Com base em ensaios preliminares, estabeleceu-se como padrão para o tratamento enzimático, para todas as preparações enzimáticas, 1,0 unidade (U) de endo-PG por mL de

suco. A escolha de endo-PG como referência se deveu ao fato de o método de avaliação desta enzima basear-se na redução de viscosidade de solução de pectina, que é o próprio objetivo deste tratamento. Como controle de reação, as preparações enzimáticas foram substituídas por água destilada. A um volume de 10 mL de suco foi adicionado 1 mL das preparações enzimáticas diluídas, de forma a ter-se um título de endo-PG de 1 unidade por mL de suco. Os ensaios foram realizados em banho termostatizado (B. BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT WR, Alemanha). Os tratamentos enzimáticos foram conduzidos com temperaturas de 40 e 50°C, durante 60 min de reação enzimática. Após o tratamento, os sucos foram resfriados em banho de gelo para interromper a ação da enzima e filtrados em papel filtro (Whtaman nº1) para posterior análise.

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Amostragem e determinação do pH

Nos testes em FSm em frascos agitados, as amostras foram coletadas em tubos de ensaios e os valores de pH medidos em pHmetro (ANALION modelo PM 608, Brasil). Para os ensaios conduzidos em fermentador de bancada, o pH foi determinado por um sensor de pH (METTLER modelo TOLEDO-405-DPAS-SC-K8S, Brasil) conectado à cuba de cultivo.

Nos ensaios em FES, para cada amostragem foram retirados dois frascos de cultivo. Após a homogeneização do meio sólido, 1 g deste meio foi seco em estufa a 90ºC por aproximadamente 14 horas. As amostras secas foram misturadas com 10 mL de água deionizada, em frascos Erlenmeyer de 25 mL, e submetidas à agitação recíproca de 200 rpm (B. BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT, Alemanha) por 10 minutos. Os valores de pH foram determinados, então, no sobrenadante com um pHmetro (ANALION modelo PM 608, Brasil).

3.7.2 Atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG)

A atividade de exo-poligalacturonase foi estimada pela quantificação, pelo

método de Somogyi (1952), de substâncias redutoras liberadas de solução 0,25% (m/v) de ácido poligalacturônico em tampão acetato 0,1 M pH 4, tendo ácido galacturônico como padrão. O procedimento analítico completo é o seguinte:

- 50 µL da preparação enzimática diluída foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de ácido poligalacturônico;
- a mistura reacional foi colocada em banho, a 35°C, por 30 minutos;
- após esse período, 0,3 mL da amostra foi colocado em tubo de Folin-Wu contendo 0,7 mL de água destilada para a quantificação de espécies redutoras;
- ao tubo, foi adicionado 1 mL de uma mistura 4:1, respectivamente, das soluções A e B de Somogyi;
- os tubos foram agitados e colocados em banho a 100ºC por 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- a cada tubo foi, então, adicionado 2 mL da solução C de Somogyi, agitando-os até cessar o desprendimento de gás, e o volume dos tubos foi completado para 25 mL com água destilada;
- a absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS, EUA), a 540 nm, contra um branco preparado com tampão acetato 0,1 M submetido ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração através de curva de calibração construída com soluções de ácido galacturônico (Sigma), entre 100 a 500 mg/L, analisadas pelo método de Somogyi (1952). Conforme proposto por Couri & Farias (1995), uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 µmol de ácido galacturônico por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições da reação, e expressa em unidades/mL (U/mL) para FSm, e unidade/grama de massa seca para (U/g) para FES. A atividade de exo-poligalacturonase é calculada pela equação 1:

$$P_{exo} = \frac{C_{AG} \cdot V_t}{PM \cdot V_e \cdot t} \cdot dil \qquad (1)$$

Onde:

P_{exo} - atividade enzimática de exo-poligalacturonase

C_{AG} - concentração de ácido galacturônico determinada pela curva padrão (mg/L)

V_t - volume total na reação enzimática (2,05 mL)

PM - massa molecular do ácido galacturônico (194 mg/mmol)

V_e - volume de preparação enzimática diluída utilizada (0,050 mL)

t - tempo de reação (30 min)

dil - diluição aplicada à preparação enzimática

3.7.3 Atividade de endo-poligalacturonase (endo-PG)

A atividade de endo-PG foi estimada pela medida da redução da viscosidade de solução padrão de pectina cítrica (CP KELCO S.A, Brasil) 0,63% (m/v), em tampão acetato 0,05 M pH 4,0. Para a realização desse método, foram seguidos os procedimentos descritos por Malvessi (2000). A técnica utilizada é detalhada a seguir.

A solução padrão de pectina foi preparada pela dissolução de 0,63 g de pectina cítrica em 70 mL de solução tampão acetato 0,05 M pH 4. Após agitação durante uma noite, foi completado o volume da solução a 100 mL com a mesma solução tampão.

A solução tampão acetato 0,05 M pH 4,0 foi preparada utilizando-se três soluções:

solução A - ácido acético, 3,0 g; água destilada 100 mL;

solução B - acetato de sódio. $3H_2O$, 6,83 g; água destilada 100 mL;

solução C - benzoato de sódio, 10 g; água destilada 100 mL.

Foram misturados, então, 73,6 mL da solução A, 26,4 mL da solução B e 2,5 mL de solução C, completando-se, em seguida, o volume para 1000 mL com água destilada.

A execução da técnica analítica consistiu dos seguintes passos:

- a solução de pectina e a amostra diluída foram colocadas em banho termostático ajustado a 30°C por 10 minutos;
- a um tubo de ensaio, contendo 3,2 mL da amostra diluída, foram adicionados 14,8 mL da solução de pectina;
- a mistura foi incubada em banho termostático, a 30°C, por 30 minutos;
- transcorrido o tempo de reação, a viscosidade da mistura reacional foi medida em viscosímetro (BROOKFIELD modelo DV-II+, EUA);
- para cada amostra, foi feito um branco da reação com solução enzimática inativada a 100°C por 10 minutos, submetida ao mesmo procedimento descrito para a amostra.

Com os valores de viscosidade das preparações contendo a amostra ativa e inativada, foi calculada a redução de viscosidade (A) através da equação 2:

$$A=\frac{\text{viscosidade da amostra inativada-viscosidade da amostra}}{\text{viscosidade da amostra inativada}} \cdot 100 \qquad (2)$$

Para a conversão de "A" em atividade de endo-poligalacturonase, foram construídas curvas padrão da seguinte forma:

- a amostra foi submetida a uma série de diluições, sendo analisadas de acordo com a metodologia descrita e calculando-se o valor de "A" para cada diluição;
- a partir dos valores de "A", foram construídas curvas relacionando esses valores com o logaritmo decimal do inverso das diluições, representando uma proporção da concentração de enzimas;
- a concentração que resultou em 50% de redução de viscosidade foi considerada como contendo 1 unidade (U) de endo-PG no volume de amostra analisada.

Após, foi construída uma nova curva correlacionando A com o log U. Para o cálculo da atividade de endo-PG utilizou-se a equação 3.

$$P = 10^{\left(\frac{A-a}{b}\right)} \cdot \frac{1}{v} \cdot dil \qquad (3)$$

Onde:

P - atividade enzimática de endo-PG (U/mL)

A - redução de viscosidade (%)

a e b - coeficientes da curva de calibração

dil. - diluição da preparação enzimática

v - volume de preparação enzimática utilizado na análise (mL)

Finalmente, o número de unidades para cada concentração foi calculado de forma proporcional. De acordo com Gainvors *et al*. (2000), uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas expressa em unidades/mL (U/mL) para FSm, e unidade/grama de massa seca para (U/g) para FES.

3.7.4 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores livres (AR) foram quantificados pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), tendo uma solução de glicose (1,0 g/L) como padrão (Miller, 1959), cujo modo de preparo é descrito a seguir:

Dissolveu-se 2,12g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (SIGMA, Brasil), 3,92 g de hidróxido de sódio, 1,52 g de fenol e 1,66 g de metabissulfito de sódio em 283,3 mL de água com temperatura de 40°C. Após 10 minutos, adicionou-se 61,2 g de tartarato duplo de sódio e potássio, deixando a solução sob agitação por 1 hora.

Na execução da técnica, procedeu-se da seguinte forma:

- as amostras foram convenientemente diluídas em água destilada, levando-se em consideração o tempo de cultivo;
- em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 mL da amostra e 1,5 mL da solução DNS, sendo feito um "branco" da reação substituindo-se o mesmo volume da amostra diluída por água destilada;
- os tubos foram colocados em banho a 100°C, por 5 minutos, e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- foram acrescentados 8 mL de água destilada às preparações;
- a absorbância das preparações foram medidas em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS, EUA) a 545 nm.

As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose (entre 100 e 1000 mg/L) e submetidas ao mesmo procedimento.

3.7.5 Determinação da concentração celular em meios líquidos

Em ensaios com meios de cultivo isentos de sólidos em suspensão (WBE), a determinação da concentração celular foi realizada da seguinte maneira.

- no decorrer do cultivo as amostras foram retiradas e um volume conhecido filtrado em membrana de nitrato de celulose, com massa conhecida, de porosidade 0,45 μm e 47 mm de diâmetro, em um sistema de filtração (MILLIPORE, Brasil);
- as células foram intensamente lavadas com água destilada, com a finalidade de remover sólidos solúveis provenientes do meio de cultivo;

- a membrana foi colocada em uma estufa a 90°C até massa constante;
- após resfriamento da membrana em dessecador, a massa de células secas foi estimada descontando-se a massa da membrana sem células previamente conhecida;
- a concentração celular foi expressa como biomassa fúngica em grama (g) de massa seca por litro (L) de meio, determinada pela divisão da massa de células pelo volume da amostra.

3.7.6 Determinação da concentração celular em meios sólidos

A determinação da concentração celular em meios sólidos foi estimada a partir do teor de N-acetilglicosamina (NAG), obtida após hidrólise ácida da quitina da parede celular em amostras de cultivos sólidos, pelo teor de NAG presente em biomassa de *A. niger* LB 23 estimada em meio líquido (mg NAG / g de biomassa), de acordo com Aidoo *et al.* (1981). No cultivo líquido, utilizou-se 0,1 g de biomassa fúngica seca, sendo os demais reagentes utilizados em quantidades proporcionais às informadas a seguir.

- adicionaram-se 5 mL de HCl concentrado a 0,5 g da amostra e a mistura foi colocada em banho de água fervente por 2 horas;
- em seguida, a preparação foi resfriada, filtrada e neutralizada, na presença de fenolftaleína 0,5 % (m/v), com NaOH 3 M, com titulação reversa feita com $KHSO_4$ 1 % (m/v);
- completou-se o volume para 25 mL com água destilada;
- a 1 mL da solução diluída, adicionou-se 1 mL da solução de acetilacetona / Na_2CO_3 (0,5 M), colocando-se a mistura em banho de água fervente por 20 minutos;
- após resfriamento, adicionaram-se 6 mL de etanol e 1 mL de solução de 4-dimetilaminobenzaldeído;
- os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e a absorbância lida a 530 nm, sendo as concentrações de NAG obtidos a partir de curva padrão construída com concentrações de glicosamina em água entre 0,01 e 0,2 g/L.
- a concentração celular em meio sólido foi expressa como biomassa fúngica (mg/mg)

3.7.7 Determinação da clarificação dos sucos

A clarificação dos sucos de frutas foi determinada com base na intensidade de cor (IC) de cada suco. Para o suco de maçã, foi realizada leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 440 nm e 520 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS, EUA), sendo a primeira correspondente à cor amarela, resultante da oxidação dos polifenóis, e a segunda à cor vermelha, resultante dos pigmentos antocianínicos da fruta (Tanner & Brunner, 1985). Para o suco de mirtilo, foi realizada leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS, EUA). O comprimento de onda de 420 nm corresponde à cor amarela, ou à quantidade de taninos; a medida em 520 nm corresponde à cor vermelha, revelando a presença de antocianinas, e o comprimento de onda de 620 nm indica à tendência a cor violeta-azul, resultado da presença de produtos das condensações entre catequinas e antocianinas (Rangana, 1977). A intensidade de cor (IC) de cada suco foi expressa com base na soma das absorbâncias das 440 nm e 520 nm (equação 4) e 420 nm, 520 nm e 620 nm (equação 5), para sucos de maçã e de mirtilo, respectivamente.

$$IC = A_{440} + A_{520} \qquad (4)$$

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620} \qquad (5)$$

A clarificação foi expressa em % de clarificação, calculada com base na intensidade de cor do suco controle e do suco tratado, de acordo com a equação 6.

$$\text{Clarificação (\%)} = \frac{\text{IC do suco controle - IC do suco tratado}}{\text{IC do suco controle}} .100 \qquad (6)$$

3.7.8 Determinação da redução de turbidez de sucos de frutas

A redução da turbidez nos sucos tratados foi calculada com base na absorbância de cada suco, medida no comprimento de onda de 540 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS, EUA) (Chatterjee *et al*. 2004). A redução da turbidez foi expressa em % de redução de turbidez, calculada com

base na absorbância (Abs) do suco controle e do suco tratado, de acordo com a equação 7.

$$\text{Redução da turbidez (\%)} = \frac{\text{Abs do suco controle - Abs do suco tratado}}{\text{Abs do suco controle}} \times 100 \qquad (7)$$

3.7.9 Determinação da redução de viscosidade de sucos de frutas

A viscosidade de sucos de frutas foi medida em viscosímetro (BROOKFIELD modelo DV-II+, EUA) em amostras de 20 mL à temperatura de 30ºC (Aguiló-Aguayo *et al.* 2010). A redução da viscosidade foi expressa em % de redução, calculada com base na medida da viscosidade (Visc) do suco controle e do suco tratado, de acordo com a equação 8.

$$\text{Redução da viscosidade (\%)} = \frac{\text{Visc do suco controle-Visc do suco tratado}}{\text{Visc do suco controle}} .100 \qquad (8)$$

3.7.10 Determinação de polifenóis totais

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por quantificação espectrofotométrica, com uso do reagente comercial Folin-Ciocalteau, através da formação de um complexo azul resultante da oxidação dos fenóis presentes na amostra de acordo com Moyer *et al.* (2002), da seguinte maneira:

- a 1 mL de amostra devidamente diluída, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 10%;
- a mistura permaneceu em repouso durante 2 horas;
- após este tempo, foi adicionado às preparações 0,2 mL do reagente Folin-Ciocalteau 2N, e as amostras permanecerem em repouso por 1 hora;
- foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 765 nm contra um branco de água pura.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 ml de suco.

3.7.11 Determinação da atividade antioxidante total dos sucos

A atividade antioxidante total (AAT) de sucos foi determinada conforme descrito por Nenadis *et al*. (2004), pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), a partir da curva construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), como descrito a seguir:

- em um ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30µL de cada diluição dos sucos para tubos de ensaios, juntamente com 3,0 mL da solução do radical ABTS;
- decorridos 6 minutos, foi realizada a leitura da mistura reacional em espectrofotômetro (GENESYS modelo 10UV, Brasil), com comprimento de onda de 734 nm, contra um ensaio em branco com álcool etílico;

A atividade antioxidante total foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com Trolox (entre 100 e 2000 µM). A AAT foi expressa em µM Trolox/mL.

3.8 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados por análise de variância (one-way ANOVA) e teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ($p<0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados alcançados no presente trabalho.

Primeiramente, no item 4.1, são apresentados e discutidos os resultados referentes ao isolamento e à seleção de fungos filamentosos, avaliando-se a sua capacidade de degradar pectina em meio sólido, pela formação de halos em placas de Petri. Também são apresentados os resultados dos ensaios em FES e FSm destinados a avaliar a capacidade de secreção de poligalacturonases dos isolados selecionados, em processos em estado sólido (FES) e submerso (FSm), em comparação com os resultados obtidos com as linhagens fúngicas padrão, consideradas como eficientes produtoras destas enzimas: *A. niger* T0005007-2 (Fontana *et al*. 2005) e *A. oryzae* IPT 301 (Fontana *et al*. 2009). No final desta seção, é apresentada a identificação dos isolados selecionados e os resultados da análise micotoxicológica dos extratos enzimáticos produzidos por estes.

Nos itens 4.2 e 4.3, após *screening* dos isolados, discutem-se experimentos com as linhagens selecionadas e identificadas: *A. niger* LB23, em cultivo em estado sólido, e *Aspergillus fumigatus* LB39J, em cultivo submerso.

No item 4.2, são apresentados e discutidos os efeitos do pH e da temperatura de reação sobre as poligalacturonases de *A. niger* LB23 em comparação com as produzidas por *A. niger* T0005007-2. A estabilidade térmica das PG da linhagem LB23 foi também avaliada. Adicionalmente, foram testadas diferentes concentrações de pectina, como indutor, e de glicose, como fonte de carbono, no meio de produção de poligalacturonases por *A. niger* LB23 em cultivo em estado sólido.

No item 4.3, os parâmetros pH e temperatura de reação enzimática e, ainda, a termoestabilidade das poligalacturonases de *A. fumigatus* LB39J são avaliados em comparação com as enzimas produzidas por *A. oryzae* IPT 301. Foram testadas, ainda, diferentes concentrações de pectina, como indutor, e de glicose, como fonte de carbono, e valores de pH iniciais no meio de produção de poligalacturonases por *A. fumigatus* LB39J em cultivo submerso.

No item 4.4, são apresentados os resultados referentes à clarificação, redução de viscosidade e turbidez dos sucos de maçã (*Malus domestica*) cv Gala e mirtilo (*Vaccinium myrtilus*) cv Bluegem e Clímax, com os extratos obtidos com as linhagens *A. niger* LB23 (TE3) e *A. fumigatus* LB39 (TE4), comparando-os com os de *A. niger* T0005007-2 (TE1),

A. oryzae IPT 301 (TE2) e as preparações comerciais (PC e PB). Nesta ultima seção, são apresentados e discutidos os resultados referentes ao teor de polifenóis e à atividade antioxidante total destes sucos.

4.1 Seleção de fungos filamentosos para a produção de poligalacturonases

A formação de pectinases pelos 60 isolados fúngicos em teste foi determinada pela formação de halo de degradação de pectina em meio sólido (MP) e semi-quantitativamente determinada pela relação entre os diâmetros do halo e da colônia (H/C). Os resultados são apresentados na Tabela 3. Esta tabela também apresenta a relação H/C de *A. niger* T0005007-2 e de *A. oryzae* IPT 301.

Os dados mostraram que dos 60 isolados fúngicos, apenas três (5%) não cresceram no meio de cultura e oito (13%) não degradaram a pectina cítrica em meio sólido; os demais 49 isolados (81%) apresentaram diferentes diâmetros de halos da degradação da pectina, indicando que possuem atividade pectinolíticas extracelular. Destes 49 isolados, 21 (42%) foram selecionados para a continuidade dos testes por apresentarem relação H/C iguais ou maiores que 2,0, conforme o critério adotado.

Na Tabela 4, são apresentados os resultados de atividades de endo-PG produzidas pelos isolados fúngicos que apresentaram a relação H/C $\geq$ 2,0, e pelas linhagens controle *A. niger* T0005007-2 e *A. oryzae* IPT 301. Foi também incluído os resultados referentes à capacidade pectinolítica de um fungo filamentoso pertencente à coleção do Laboratório de Bioprocessos do IB/UCS, codificada como 39J.

Nos cultivos em estado sólido, alguns isolados – especialmente os identificados como 1, 5, 6, 23 e 37 – apresentaram títulos de endo-PG comparáveis ao da linhagem *A. niger* T0005007-2. Entretanto, somente com o isolado 23, que nos testes preliminares apresentou a mais alta relação H/C (juntamente com o isolado 22), determinou-se título enzimático estaticamente igual ao da linhagem padrão *A. niger* T0005007-2. Nos cultivos submersos, nenhum dos novos isolados mostrou capacidade de produção de endo-PG igual ou superior ao *A. oryzae* IPT 301. O isolado 39J, no entanto, apresentou títulos enzimáticos estatisticamente iguais a linhagem de referência.

Já foi constatado por outros autores que a produção de enzimas pelo cultivo em estado sólido leva à obtenção de níveis de atividade superiores aos obtidos em cultivo submerso (Nigam & Singh, 1994; Mitchell *et al*. 2000), talvez pelo fato de o cultivo em estado sólido aproximar-se muito do ambiente natural dos fungos filamentosos. No caso, a adesão dos fungos filamentosos às partículas do substrato, durante o crescimento no cultivo em estado sólido, é uma importante propriedade destes microrganismos, uma vez que favorece a absorção dos nutrientes (Cordova-Lopez *et al*. 1996), e serve de suporte para o crescimento destes (Pandey, 2003).

Tabela 3. Diâmetros da colônia e halos, e a relação halo/colônia (H/ C) dos isolados fúngicos das linhagens padrão *Aspergillus niger* T0005007-2 e *Aspergillus oryzae* IPT .

		Diâmetros (cm)		Relação			Diâmetros (cm)		Relação
Isolados	**Amostra**	**Colônia**	**Halo**	**H/C**	**Isolado**	**Amostra**	**Colônia**	**Halo**	**H/C**
1	limão	2,0	4,0	2,0	**31**	doce de figo	1,0	1,8	1,8
2	bergamota	0,9	1,6	1,8	**32**	mamão	0,8	2,0	2,8
3	maçã fuji	1,3	1,8	1,4	**33**	mamão papaia	1,6	3,6	2,3
4	bergamota	0,9	1,1	1,2	**34**	goiaba	1,0	2,3	2,3
5	bergamota	1,7	3,5	2,1	**35**	maçã fuji	1,0	2,4	2,4
6	bergamota	1,5	3,5	2,3	**36**	cebola	ND	ND	-
7	bergamota	1,6	3,8	2,4	**37**	maçã	0,7	1,8	2,7
8	bergamota	2,0	4,0	2,0	**38**	manga verde	0,7	1,1	1,6
9	banana	1,1	1,6	1,4	**39**	café	1,1	1,5	1,4
10	goiaba	2,3	ND	-	**40**	geleia	0,9	1,6	1,8
11	goiaba	0,8	2,0	2,5	**41**	chuchu	1,0	1,2	1,2
12	tomate	ND	ND	-	**42**	batata doce	ND	ND	-
13	bergamota	0,9	1,7	1,9	**43**	limão	1,1	1,5	1,4
14	goiaba	2,3	4,5	2,0	**44**	cenoura	0,9	1,1	1,2
15	mamão	0,9	1,6	1,8	**45**	cenoura	1,1	1,5	1,4
16	limão	1,5	3,0	2,0	**46**	morango	0,9	1,5	1,7
17	bergamota	1,8	3,5	2,0	**47**	abacate	1,1	1,5	1,4
18	bergamota	1,0	2,8	2,8	**48**	couve-flor	0,6	1,0	1,7
19	banana	0,9	1,3	1,4	**49**	couve-flor	0,7	0,9	1,3
20	banana	0,5	1,7	3,4	**50**	amora	0,7	1,1	1,6
21	bergamota	0,5	1,1	2,2	**51**	abacate	1,2	1,9	1,6
22	goiaba	0,8	2,5	3,6	**52**	brócolis	0,9	1,4	1,6
23	romã	0,5	1,8	3,6	**53**	pera	3,1	ND	-
24	goiaba	1,4	1,8	1,3	**54**	melão	0,3	ND	-
25	bergamota	0,9	1,3	1,4	**55**	goiaba	1,0	1,6	1,6
26	morango	1,1	ND	-	**56**	pepino	1,1	1,7	1,5
27	café	0,5	ND	-	**57**	melão	0,9	1,3	1,4
28	abacate	2,0	4,0	2,0	**58**	melão	0,2	ND	-
29	uva passa	1,3	ND	-	**59**	couve roxo	0,7	1,1	1,6
30	romã	1,3	1,7	1,3	**60**	maracujá	0,5	ND	-
A. oryzae		2,4	0,8	3,2	***A. niger***		2,8	1,0	2,8

*ND – não detectado. Os valores correspondem à média de triplicatas

Tabela 4. Atividade de endo-poligalacturonase produzida em cultivos de isolados fúngicos e das linhagens padrão *Aspergillus niger* T0005007-2 em cultivo em estado sólido e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em cultivo submerso.

Isolados	Cultivo sólido (U/g)	Cultivo submerso (U/mL)
1	71,00±0,48^{b}	3,33±0,13^{ij}
5	70,75±0,41^{b}	7,92±0,70^{g}
6	69,50±0,29^{b}	14,30±0,10^{e}
7	54,25±0,48^{f}	3,36±0,29^{ij}
8	61,75±0,25^{cd}	5,33±0,24^{h}
11	55,00±0,41^{f}	3,89±0,21^{i}
14	38,75±0,25^{h}	12,55±0,31^{f}
16	56,75±0,85^{ef}	3,60±0,38^{ij}
17	40,00±0,00^{h}	2,38±0,08^{j}
18	64,25±0,48^{c}	17,11±0,53^{d}
20	61,25±0,25^{d}	5,18±0,39^{h}
21	46,00±0,48^{g}	2,18±0,14^{l}
22	56,50±1,19^{ef}	22,65±0,48^{b}
23	74,50±0,29^{a}	23,19±0,32^{b}
28	56,75±0,48^{ef}	3,53±0,41^{ij}
32	52,25±0,25^{g}	2,32±0,05^{j}
33	29,50±0,29^{i}	3,15±0,49^{ij}
34	59,50±0,64^{d}	17,62±0,37^{d}
35	59,00±0,58^{ed}	17,64±0,52^{d}
37	69,75±0,63^{b}	19,50±0,63^{c}
39J	31,87±0,31^{i}	34,45±0,25^{a}
***A. niger* T0005007-2**	73,50±0,64^{a}	-
***A. oryzae* IPT 301**	-	33,86±0,86^{a}

Os valores correspondem à média de triplicatas. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$). Atividades medidas em 72 h de processo para os cultivos em estado sólido e 96 h de processo para os cultivos submersos

Na sequencia, foi realizada a identificação dos isolados 23 e 39J através de taxonomia convencional, baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem. Os isolados 23 e 39J foram identificados como *A. niger* e *A. fumigatus* Fresenius, respectivamente. Na continuação deste trabalho, estas linhagens passam a ser referidas como *A. niger* LB23 e *A. fumigatus* LB39J.

Objetivando aplicar os extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* LB23 e *A. fumigatus* LB39J em processos da indústria de alimentos, estes foram analisados quanto à presença de aflatoxinas totais. Os resultados das análises de micotoxicidade revelaram que estas linhagens não produzem micotoxinas. Pelo ensaio imunoenzimático, que emprega anticorpos monoclonais - ELISA (Neogen) (Newsome, 1986), constatou-se, também, que os extratos enzimáticos produzidos por estas linhagens, nas condições estudadas, não

apresentam aflatoxinas totais (B1, B2, G1, G2) em um limite de detecção de 2 µg/Kg. O teor de aflatoxinas nos extratos enzimáticos é inferior ao limite estabelecido pelo Ministério da Saúde ANVISA (1976), que define 30 µg/Kg, calculado pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B1 e G1, como limite de tolerância para as aflatoxinas em preparações para uso na indústria de alimentos. Este resultado é muito importante, uma vez que é inviável a aplicação de microrganismos micotoxigênicos em processos industriais devido às atividades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas de seus metabólitos secundários em animais e no homem dependendo dos níveis de consumo (Frisvad *et al*. 2005).

4.2 Produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* LB23 em cultivo em estado sólido

A capacidade pectinolítica de *A. niger* LB23 foi avaliada em cultivo em estado sólido. Como controle, foi realizado um cultivo de *A. niger* T0005007-2 nas mesmas condições. Nestes ensaios, foram acompanhadas as variações das atividades de poligalacturonases, pH e a biomassa fúngica em função do tempo de processo.

Observa-se, pela Figura 3, a variação das atividades enzimáticas em função do tempo de processo, sendo que as atividades máximas de endo-PG foram de 94 e 87 U/g, para *A. niger* LB23 e *A. niger* T0005007-2, respectivamente, em 72 h de processo. Após este período foi constatada uma leve queda nos valores de atividade, que se mantiveram praticamente constantes até 120 h de processo. Da mesma forma, foi detectado um aumento gradual de atividade de exo-PG até 72 h de processo, atingindo títulos de 142 e 165 U/g, para *A. niger* LB23 e *A. niger* T0005007-2, respectivamente. Neste caso, porém, verificou-se rápido decréscimo da atividade nos cultivos dos dois fungos, após a obtenção da máxima biomassa fúngica. O mesmo comportamento foi evidenciado por Fontana *et al.* (2005) em estudo com *A. niger* T0005007-2 em cultivo em estado sólido; os autores associaram esta queda à escassez de algum nutriente essencial ou a problemas de transferência de oxigênio provocados pela compactação do meio.

A Figura 4 apresenta a biomassa fúngica durante 60 h e variação do pH em função do tempo de processo. Comparando-se as Figuras 3 e 4, verifica-se que a formação das poligalacturonases se apresenta predominantemente associada ao crescimento das duas linhagens de *A. niger*, pois, como pode ser observado, os perfis das curvas de crescimento celular e atividades enzimáticas são semelhantes, principalmente para endo-PG.

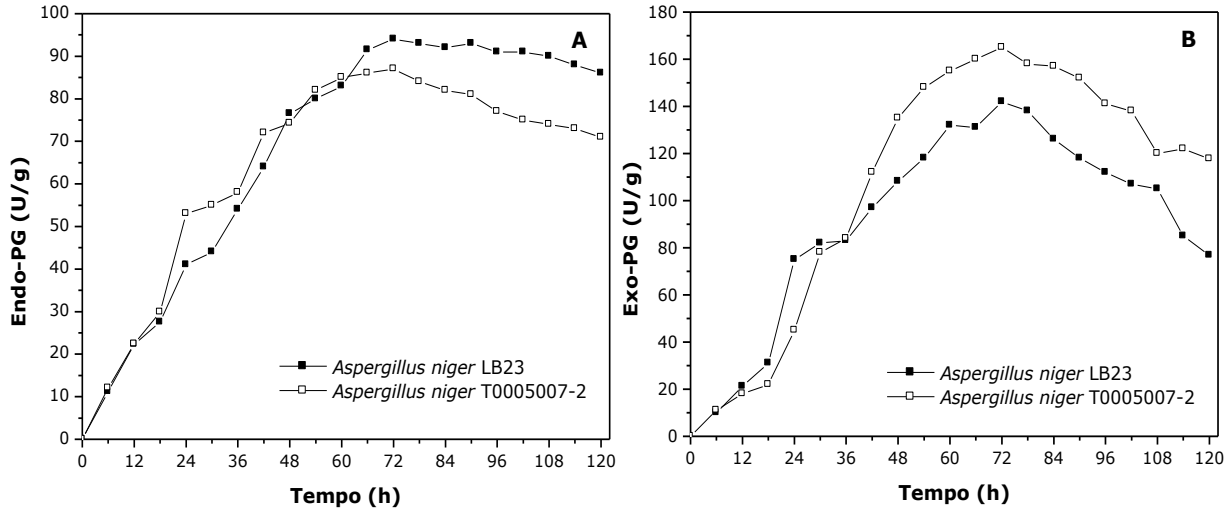


Figura 3. Variação da atividade endo (A) e exo (B) poligalacturonase em função do tempo de processo, em cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 e *Aspergillus niger* T0005007-2.

Constata-se que mesmo não sendo possível o controle do pH, este parâmetro permanece em valor compatível com a produção das poligalacturonases que, segundo vários autores encontra-se entre 4,5-5,0. Fontana *et al*. (2005) constataram produção de PG em cultivo sólido por *A. niger* T0005007-2 com pH inicial do meio de 4,5, valor ideal semelhante foi descrito para a produção de pectinases por *Moniliella*, *Penicillium* e *Thermoascus aurantiacus* por (Martins *et al*. 2002, 2004).

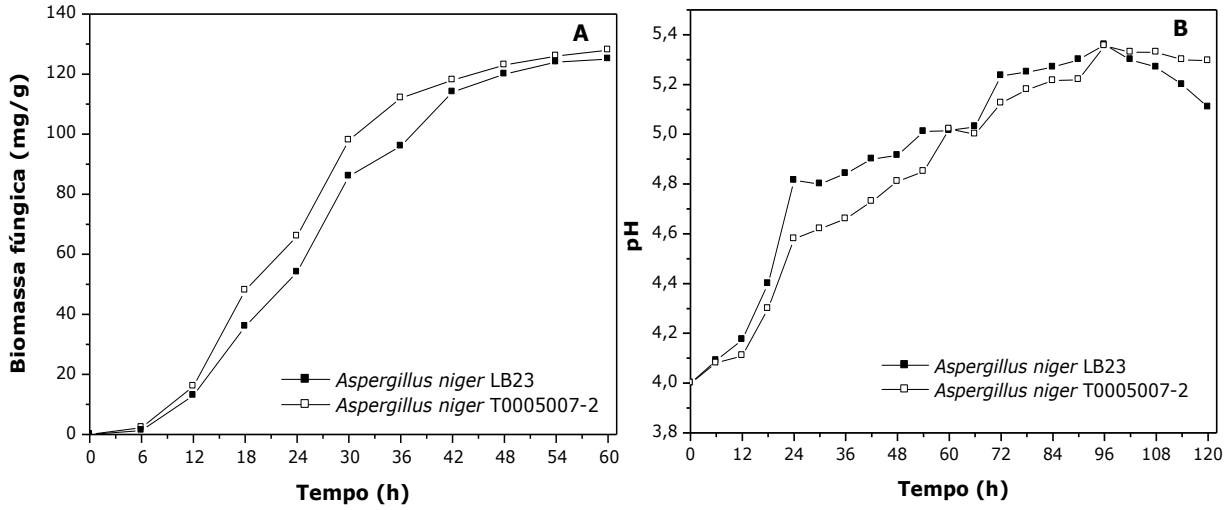


Figura 4. Biomassa fúngica (A) durante 60 h e variação do pH (B) em função do tempo de processo, em cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 e *Aspergillus niger* T0005007-2.

Observa-se que a curva de crescimento celular apresentou uma fase "lag" de cerca de 8 h e, após, um perfil linear em relação ao tempo. A partir de cerca de 30 h de processo,

observou-se uma gradativa redução da velocidade de crescimento, com o cultivo tendendo a entrar na fase estacionária com 50 h.

Os dados do processo mostrado na Tabela 5 demonstram que *A. niger* LB23 teve desempenho comparável ao *A. niger* T0005007-2, ainda que os parâmetros e o meio de cultivo utilizado tenham sido os previamente para definidos para a linhagem referência. Ou seja, este desempenho ainda pode melhorar.

Tabela 5. Resultados obtidos nos cultivos em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 e *Aspergillus niger* T0005007-2**.**

	***A. niger* LB23**	***A. niger* T0005007-2**
$X_{máx}$ (mg/g)	125	128
$t_{x,\ máx}$ (h)	60	60
pH $_{PG\ Max}$	5,23	5,12
Endo-$PG_{máx}$ (U/g)	94	87
Exo-$PG_{máx}$ (U/g)	142	165
P $_{endo\text{-}PG}$ (U/mg/h)	1,30	1,20
P $_{exo\text{-}PG}$ (U/mg/h)	1,97	2,29

X_{max}- biomassa fúngica máxima
$t_{x,\ máx}$–tempo para atingir concentração máxima de células
pH $_{PG\ máx}$ –pH no tempo de atividade máxima de endo e exo-PG
Endo-$PG_{máx}$–atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG,
P $_{PG}$ – produtividade em endo e exo-PG

4.2.1 Influência do pH e da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 em cultivo sólido

Ao analisar-se o efeito do pH sobre as poligalacturonases produzidas por *A. niger* LB23 e *A. niger* T0005007-2 (Figura 5), constatou-se que máximas atividades de endo-PG foram obtidas com valor de pH 4,0, sendo que em pH 3,0 mais de 80% da atividade máxima ainda era mantida. Uma vez que este intervalo de pH (3,0-4,0) é frequente em muitos sucos de frutas, os dados obtidos sugerem que estes extratos possam vir a ter uma aplicabilidade na indústria. Jayani *et al*. (2005) relataram que os valores de pH de ação da maioria das poligalacturonases de origem microbiana oscila em valores de pH ácidos, concordando com os resultados determinados no presente estudo.

Por outro lado, observou-se comportamento muito distinto entre os extratos produzidos pelas duas linhagens de *Aspergillus*, no que se refere à exo-PG produzida por *A. niger* LB23, apresentou atividade máxima em pH 4,0; entretanto, para a exo-PG produzida por *A. niger* T0005007-2, máxima atividade enzimática foi obtida em valor de pH 6,0. Este resultado diverge de estudos desenvolvidos por Bailey & Pessa (1990) que constataram que o pH ótimo para a atividade de exo-PG de *A. niger* se encontra numa faixa estreita, entre 4,5 e 5,0, com atividade residual acentuada fora desta faixa.

O fato de as atividades de endo e exo-PG produzidas por *A. niger* LB23 apresentarem máximas atividades em pH 4,0 é positivo já que, assim, seria favorecido o sinergismo entre as duas enzimas no tratamento de sucos de frutas com pH nesta faixa

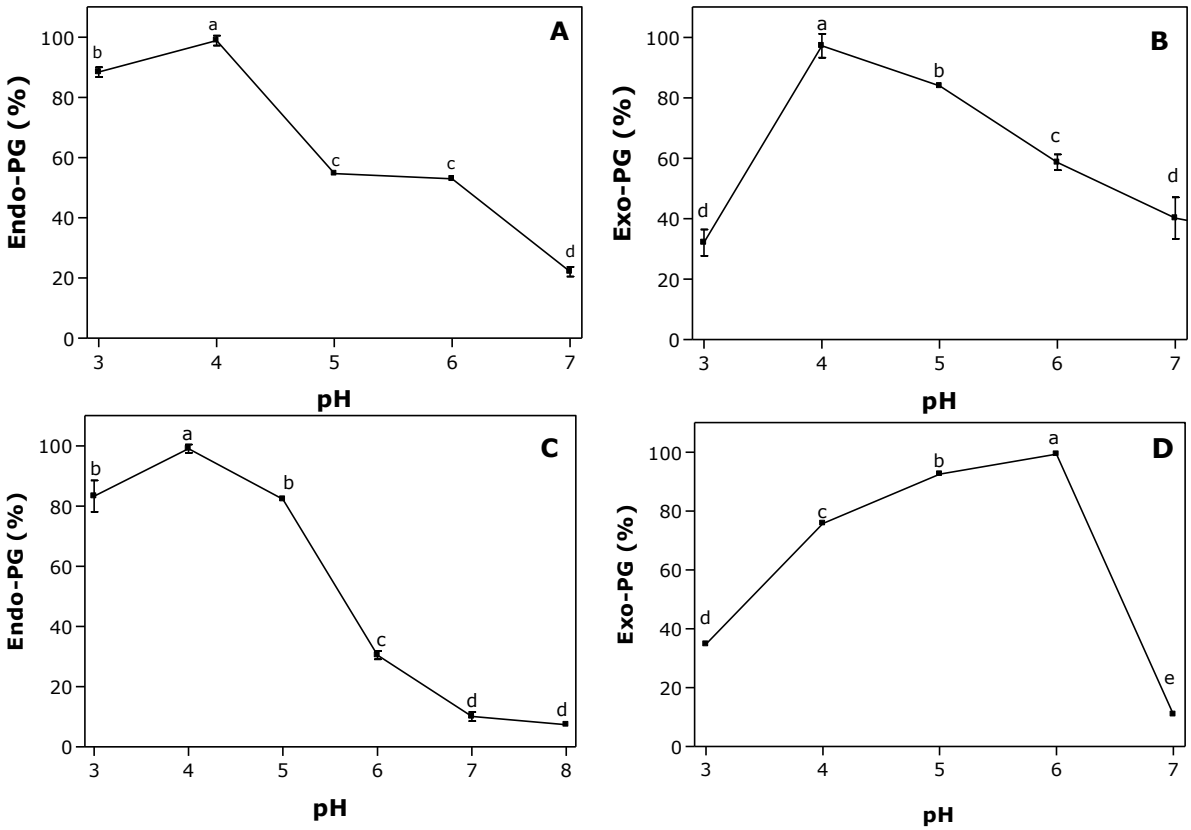


Figura 5. Efeito do pH sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 (A) e (B) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. Os valores correspondem à média de duplicatas. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$).

O estudo do efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade poligalacturonase indicou 40 e 50°C como as melhores para as atividades endo-PG produzidas por *A. niger* LB23 e *A. niger* T0005007-2 (Figuras 6A e 6C). Kashyap *et al*. (2001), em seu trabalho de revisão, descrevem as poligalacturonases produzidas por *A. niger* com atividade máxima em torno de 50ºC. Com relação à influência da temperatura sobre a atividade de exo-PG, observou-se que os melhores resultados foram obtidos entre 50 e 60°C. Acuña-Arguelles *et al*. (1995) estabeleceram a temperatura ótima para a atividade de exo-PG de *A. niger* entre 45 e 50ºC. Em outro estudo, Sakamoto *et al*. (2002) determinaram 60°C como sendo a temperatura ótima para exo-PG produzida por *A. niger*. A comparação entre estes resultados mostra que a temperatura ideal para exo-PG é dependente da linhagem produtora.

Destaque-se que as poligalacturonases produzidas por *A. niger* LB23 apresentam aproximadamente 80 e 60% das atividades de endo e exo-PG, respectivamente, com temperatura de reação de 70ºC. Esses resultados denotam uma boa aplicabilidade industrial sob temperaturas relativamente altas, como na indústria de sucos e bebidas, embora tenham

apresentado queda de 85 e 46% para as atividades de endo e exo-PG respectivamente, quando a reação foi conduzida a 80ºC.

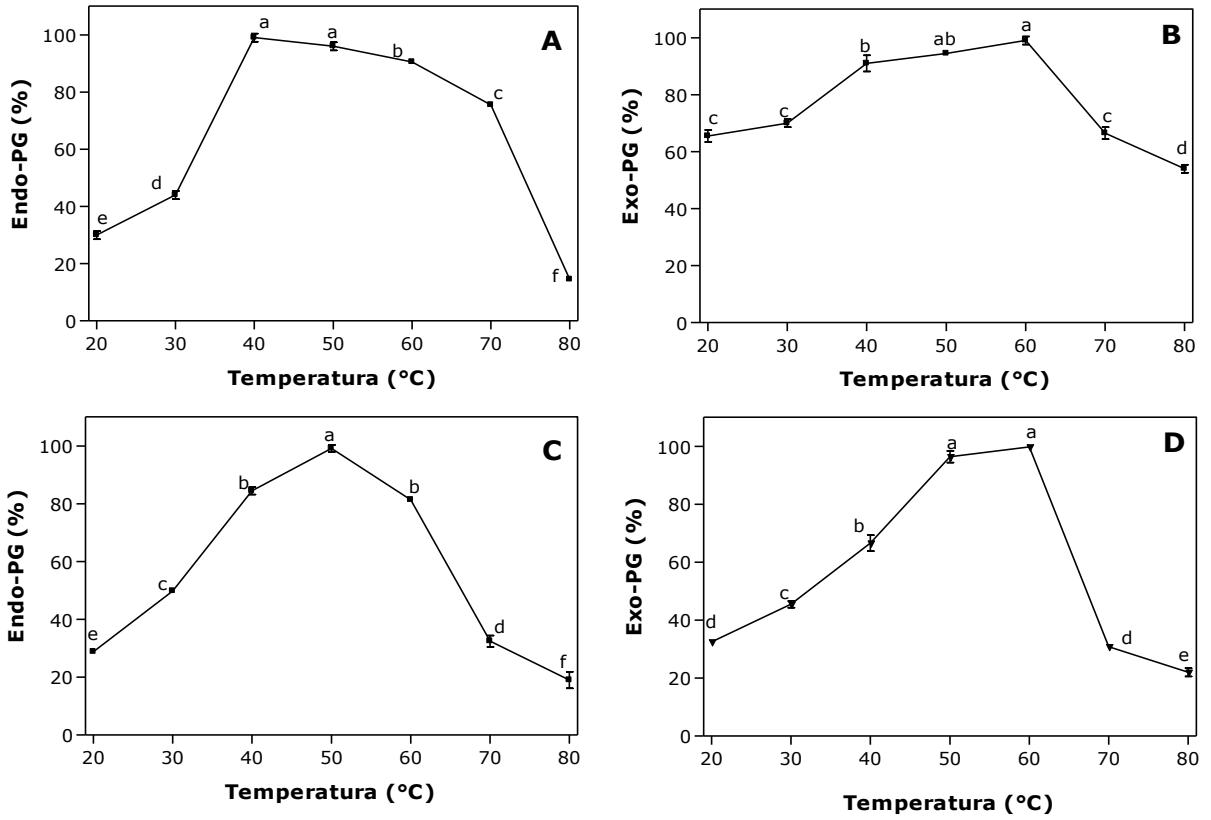


Figura 6. Efeito da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 (A) e (B) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. Os valores correspondem à média de duplicatas. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$).

Através da observação dos perfis de estabilidade frente à temperatura com diferentes tempos de pré-incubação dos extratos enzimáticos brutos, foi possível constatar que maior termoestabilidade de endo-PG ocorreu nas temperaturas de 20, 30 e 40ºC. Aplicando-se a temperatura de 50ºC ao extrato enzimático foi constatado aproximadamente 30 e 40% da atividade inicial após 150 minutos de exposição. Já em temperaturas de 60 e 70ºC, a atividade de endo-PG foi drasticamente afetada, principalmente para a endo-PG produzida por *A. niger* T0005007-2, observando-se perda total da capacidade catalítica da enzima, após 40 minutos (Figuras 7A e 7C).

Para atividade exo-PG maior estabilidade enzimática também foi observada quando os caldos enzimáticos brutos foram expostos às temperaturas de 20, 30 e 40ºC. Porém, a atividade exo-PG mostrou-se mais estável frente às temperaturas de 60 e 70°C,

ou seja, com 150 min de exposição do caldo enzimático, contatou-se, ainda, uma pequena atividade residual (Figuras 7B e 7D).

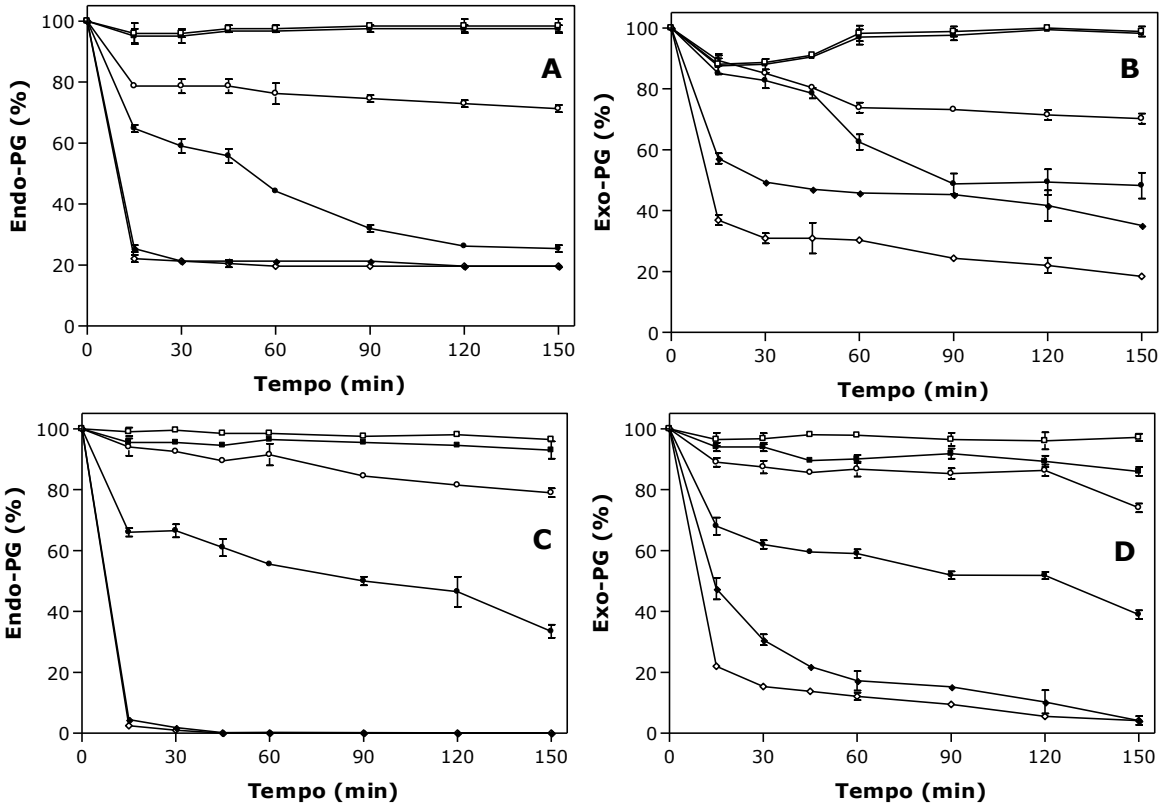


Figura 7. Estabilidade térmica das poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* LB23 (A) e (B) e *Aspergillus niger* T0005007-2 (C) e (D), mantidas as demais condições padrão de cada análise. (□) 20°C (■) 30ºC, (○) 40ºC; (●) 50ºC; (♦) 60ºC; (◊) 70ºC.

4.2.2 Influência da pectina e da glicose sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* LB23 em cultivo em meio sólido

A síntese das PG sofre a influência dos componentes do meio de crescimento, particularmente do tipo e da concentração da fonte de carbono e da presença de indutores (pectina e derivados) (Blandino *et al*. 2001; Fontana *et al.* 2005, Teixeira *et al*. 2000). Desta forma, buscando-se incrementar a produção enzimática por *A. niger* LB23, foram realizados ensaios com concentrações iniciais de pectina até 25% (m/m), mantendo-se fixa a concentração de glicose em 10 % (m/m).

Os resultados mostraram que concentrações de pectina de 0 até 10% (m/m) favorecem a produção de PG (Figura 8). Nos cultivos com concentrações de pectina 20 e 25% (m/m), observou-se uma forte redução da produção. Altas concentrações de pectina podem ter ocasionado compactação do meio de cultivo, gerando problemas de difusão do oxigênio, como já foi reportado em Fontana *et al*. (2005) em cultivo em estado sólido com *A. niger* T0005007-2. Via de regra, partículas pequenas possuem uma maior área superficial para a utilização, pelo microrganismo, no entanto, podem resultar na aglutinação do substrato e endurecimento do meio, o que, consequentemente, interfere na aeração do sistema, bem como na utilização do oxigênio pelos microrganismos (Pandey *et al*. 2000). Altas concentrações de pectina podem, também, ter prejudicado o crescimento celular e afetado a produção das poligalacturonases. Neste ensaio não foi estimado o crescimento celular de *A. niger* LB23, mas Fontana *et al*. (2005) observaram que concentrações de pectina de 20 a 30% (m/m) levaram a um decréscimo na produção de biomassa por *A. niger* T0005007-2 em cultivo em estado sólido.

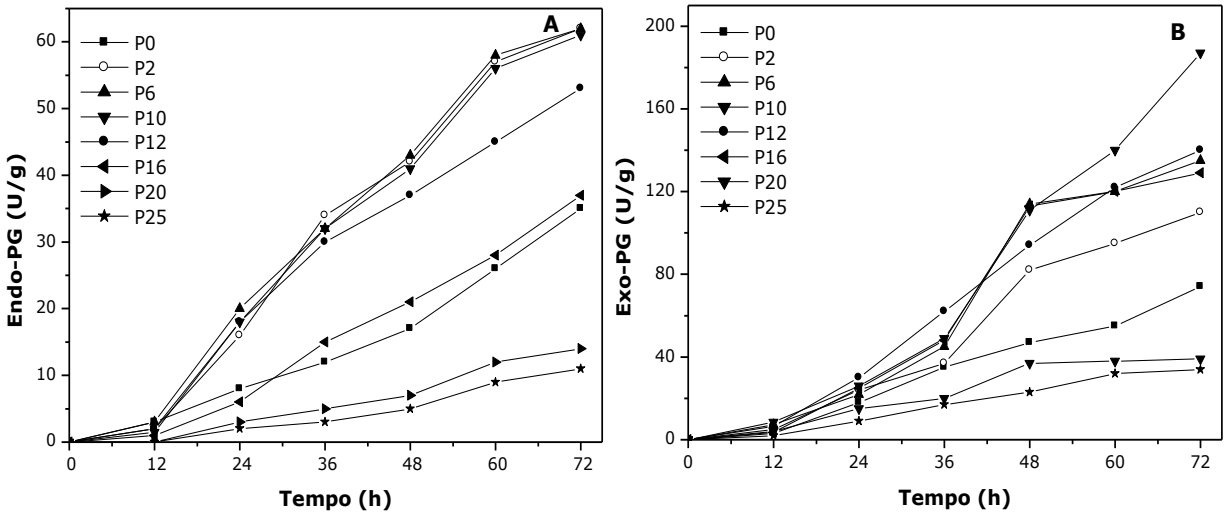


Figura 8. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo em estado sólido do *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de pectina. P0, P2, P6, P10, P12, P16, P20 e P25 - pectina: 0, 2, 6, 10, 12, 16, 20 e 25% (m/m)

A redução da atividade poligalacturonásica em altas concentrações de pectina também pode estar relacionada ao pH, pois quanto maior a concentração de pectina inicial, menores foram os valores finais de pH, especialmente em concentrações iguais ou superiores a 16% (m/m) (Figura 9).

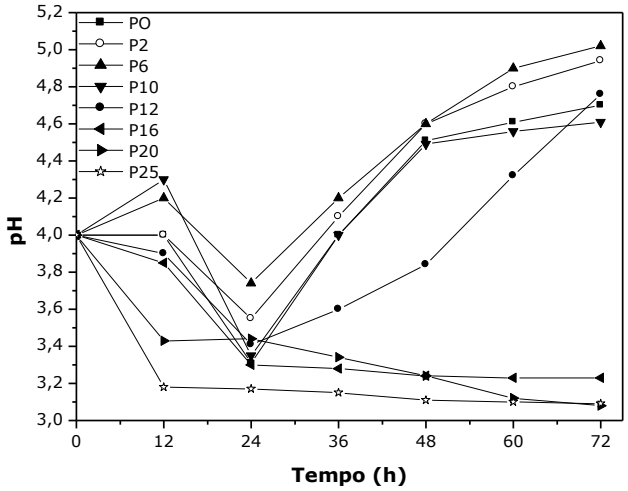


Figura 9. Variação do pH em função do tempo de cultivo em estado sólido de A*spergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de pectina. P2, P6, P10, P12, P16, P20 e P25 - pectina: 0, 2, 6, 10, 12, 16, 20 e 25% (m/m)

Na Tabela 6, são resumidos os resultados gerais encontrados nos cultivos em estado sólido de *A. niger* LB23 com concentrações de pectina de 0 a 25% (m/m) e 10% (m/m) de glicose no meio de cultivo. Conforme é mostrado nesta tabela, com 2, 6 e 10 %

(m/m) de pectina no meio de cultivo, a produção de endo-PG foi praticamente a mesma. Por outro lado, para exo-PG, teve-se um aumento gradativo na atividade com concentrações de pectina até 10% (m/m), sugerindo que a produção da exo-PG sofre maior influência com a variação da concentração de indutor

Tabela 6. Resultados obtidos no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de pectina.

	P0	**P2**	**P6**	**P10**	**P12**	**P16**	**P20**	**P25**
Endo-$PG_{máx}$ (U/g)	35	62	62	61	53	37	14	11
Exo-$PG_{máx}$ (U/g)	74	110	135	187	140	129	39	34
$pH_{Exo\text{-}PG\ Max}$	4,7	4,94	5,02	4,61	4,76	3,23	3,08	3,09

$pH_{PG\ máx}$ – pH no tempo de atividade máxima de endo e exo-PG
Endo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
P0, P2, P6, P10, P12, P16, P20 e P25 - pectina: 0, 2, 6, 10, 12, 16, 20 e 25% (m/m)

Posteriormente, foram realizados ensaios fixando-se a concentração de pectina em 6% (m/m) e variando-se a concentração de glicose entre 0 e 20% (m/m) no meio de cultivo sólido. Na Figura 10 são apresentados os resultados da produção das PG monitoradas a cada 12 h. Maior atividade de endo-PG foi obtida na ausência de glicose (61 U/g), com o aumento da concentração de glicose resultando em decréscimo da atividade enzimática. Com 20% (m/m) de glicose no meio, por exemplo, foi observada redução de aproximadamente 55% da atividade (28 U/g) em relação ao meio sem glicose. Para exo-PG, os títulos enzimáticos mais altos foram constatados na ausência e com 5% (m/m) de glicose no meio, com atividades máximas de exo-PG de 198 e 195 U/g, respectivamente, com 72 h de processo.

Desta forma, pode-se sugerir que a presença de glicose no meio exerceu um efeito repressivo sobre a produção de PG. Estes resultados divergem do estudo de Fontana *et al*. (2005), que avaliaram a influência de diferentes concentrações de glicose na produção das PG por *A. niger* T0005007-2 em cultivo em estado sólido e obtiveram melhores resultados de endo-PG com 10% (m/m) de glicose no meio. Os mesmos autores constataram que, conforme a concentração da fonte de carbono foi aumentada até 16% (m/m) de glicose no meio, maiores foram os títulos enzimáticos de exo-PG.

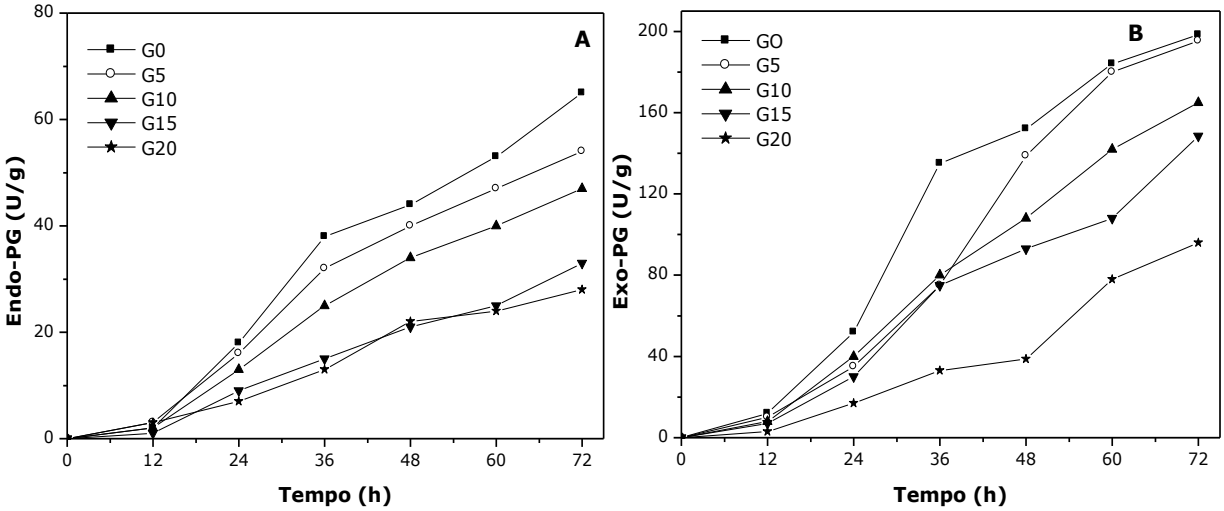


Figura 10. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante processo, no cultivo em estado sólido do *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de glicose. G0, G5, G10, G15 e G20 – glicose: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/m)

Já foi descrito que a adição de glicose a meios sólidos resulta em efeito positivo, mas que, em excesso, ocorre à redução do pH e a queda da atividade de pectinases (Solis-Pereyra *et al*. 1996; Acuña-Arguelles *et al*. 1995). Aparentemente, entretanto, a redução da atividade enzimática com altas concentrações de glicose, observada no presente trabalho, não esta relacionada à queda do pH. No caso, os meios com maior adição de glicose (15 e 20% m/m) apresentaram os menores valores de pH, entre 48 e 72 h de processo, que, entretanto, não foram inferiores a 4,0 durante todo processo (Figura 11).

Na Tabela 7 são resumidos os resultados gerais encontrados nos cultivos em estado sólido de *A. niger* LB23 com concentrações de glicose de 0, 5, 10, 15 e 20% (m/m) e 6 % (m/m) de pectina no meio.

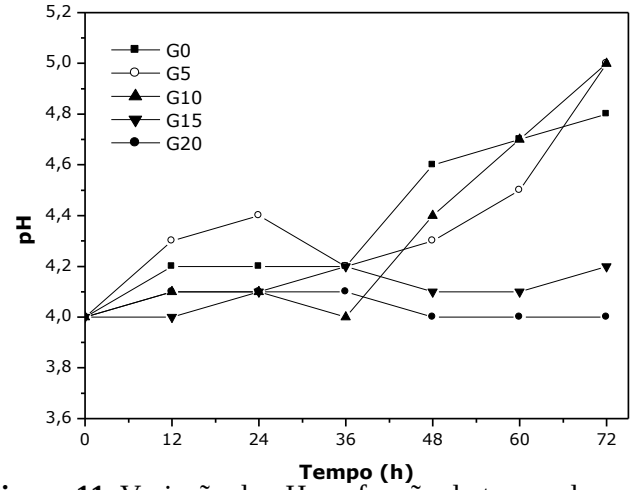


Figura 11. Variação do pH em função do tempo de processo no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de glicose. G0, G5, G10, G15 e G20 – glicose: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/m)

Os testes com diferentes concentrações de pectina e concentração fixa de glicose de 10% no meio permitem concluir que a concentração de pectina até 10% (m/m) favorece a produção de poligalacturonases. Os ensaios com diferentes concentrações de glicose e a concentração fixa de pectina em 6%, permitiram constatar que maior atividade de endo-PG foi obtida na ausência de glicose (65 U/g), enquanto que para exo-PG os títulos enzimáticos mais altos foram constatados na ausência e com 5% (m/m) de glicose ao meio, com atividades máximas de exo-PG de 198, sem glicose, e 195 U/g, com 5% (m/m) de glicose, em 72 h de processo.

Tabela 7. Resultados obtidos no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* LB23 com diferentes concentrações de glicose.

	G0	**G5**	**G10**	**G15**	**G20**
Endo-$PG_{máx}$ (U/ g)	65	54	47	33	28
Exo-$PG_{máx}$ (U/ g)	198	195	165	148	96
$pH_{PG\ máx}$	4,8	5,0	5,0	4,2	4,0

pH $_{\mathbf{PG\ máx}}$ − pH no tempo de atividade máxima de endo e exo-PG
Endo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
G0, G5, G10, G15 e G20 – glicose: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/m)

4.3 Produção de poligalacturonases por *Aspergillus fumigatus* LB39J em cultivo submerso

A capacidade pectinolítica do *A. fumigatus* LB39J foi avaliada em cultivo submerso em fermentador de bancada, em 96 h de processo, com os meios de cultivo WB (contendo farelo de trigo) e WBE (contendo o extrato aquoso do farelo de trigo). Como referência foram realizados cultivos submersos com *A. oryzae* IPT 301 nas mesmas condições. Nestes ensaios, foram acompanhadas as atividades de poligalacturonases, variações dos valores de pH do meio, concentração de oxigênio dissolvido, concentração de açúcares redutores e, apenas no meio WBE, biomassa fúngica.

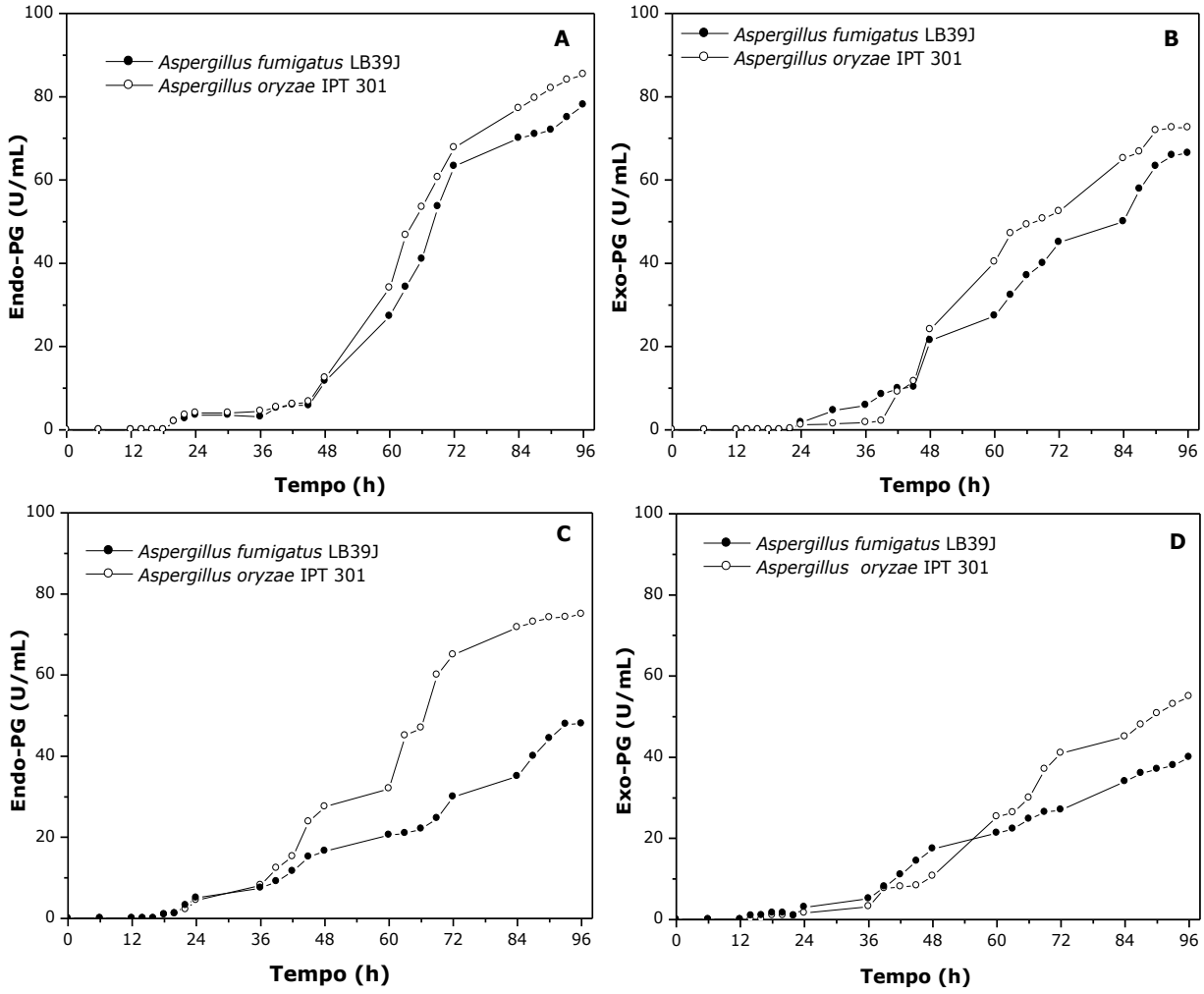


Figura 12. Variação da atividade de endo e exo-poligacturonase durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em meio WB - endo-PG (A) e exo-PG (B) e em meio WBE - endo-PG (C) e exo-PG (D), em fermentador de bancada.

A Figura 12 apresenta a variação da atividade de endo e exo-poligacturonase durante o processo. Observa-se que maiores atividades de PG foram obtidas em meio WB com os dois fungos. Em meio WBE, *A. oryzae* IPT 301 produziu níveis enzimáticos mais elevados que os de *A. fumigatus* LB39J. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de as condições de cultivo utilizadas nos ensaios – em termos de concentrações de glicose e pectina, temperatura e pH – terem sido as previamente estabelecidas para o cultivo de *A. oryzae* IPT 301 (Fontana *et al.* 2009).

No meio WB, não foi possível estimar o crescimento celular através da quantificação direta por métodos convencionais devido à presença de sólidos em suspensão (farelo de trigo). Com a formulação solúvel (meio WBE), o crescimento celular dos dois fungos apresentou o mesmo perfil (Figura 13). A partir de 16 h de processo verificou-se maior crescimento do *A. oryzae* IPT 301 em comparação ao *A. fumigatus* LB39J, indicando que este último tem um crescimento mais lento nestas condições.

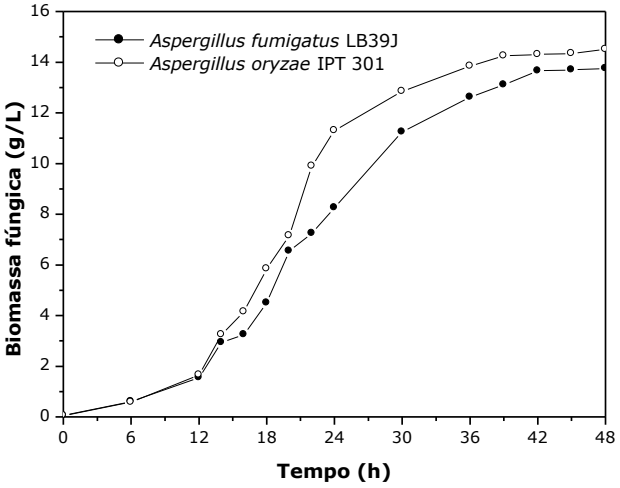


Figura 13 Variação da biomassa fúngica (X) durante as primeiras 48 h dos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em meio WBE.

A Figura 14 mostra a variação da concentração de açúcares redutores durante os cultivos submersos de *A. fumigatus* LB39J e *A.oryzae* IPT 301 em meio WB e WBE. No meio WB, não há adição de glicose, mas apenas o amido proveniente do farelo de trigo. Desta forma, no início do processo, a concentração de açúcares redutores é baixa, aumentando posteriormente em decorrência à atividade amilolítica, que é maior que o consumo em virtude da pequena concentração celular. Na sequência, a concentração de açúcares redutores decai, pois a glicose liberada do amido é rapidamente consumida pela

maior população microbiana. Já no meio WBE, que contém glicose, a concentração de açúcares redutores decai na razão inversa ao crescimento fúngico.

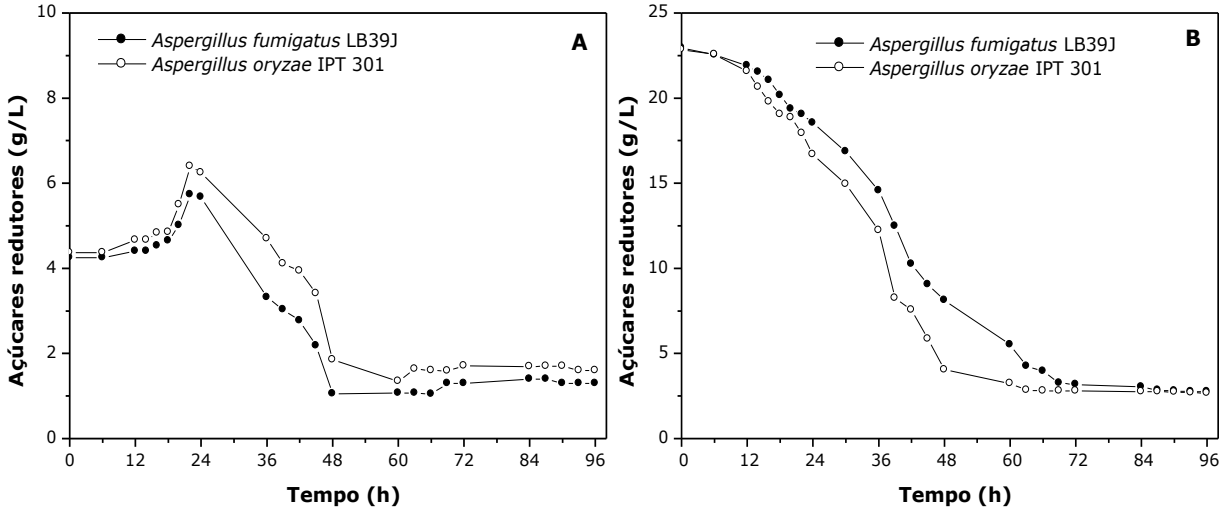


Figura 14. Variação da concentração de açúcares redutores durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 em meio WB (A) e WBE (B), em fermentador de bancada.

Como se pode observar na Figura 15, os perfis da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo foram semelhantes para os dois microrganismos, com um menor consumo para *A. fumigatus* LB39J no meio WBE. A concentração de oxigênio dissolvido é um indicativo do crescimento celular, pois, como comentado anteriormente, no meio WB não foi possível quantificar o crescimento em virtude da interferência do farelo de trigo. Observa-se um rápido decréscimo do oxigênio dissolvido após a fase "lag" em razão do intenso metabolismo microbiano, após este período, maiores concentrações de oxigênio dissolvido foram verificadas no cultivo do *A. fumigatus* LB39J, confirmado o crescimento mais lento deste microrganismo. Esta afirmação é sustentada pelos dados expostos Figura 13, quando foram apresentados os resultados da biomassa fúngica dos dois microrganismos em meio WBE.

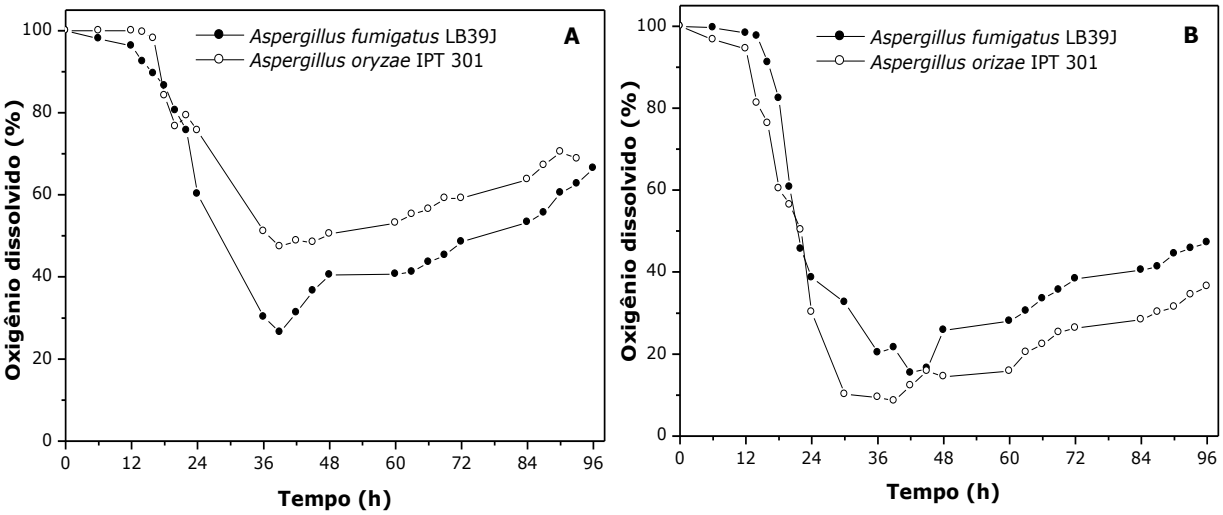


Figura 15. Variação da concentração de oxigênio dissolvido (%) durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus oryzae* IPT 301 e *Aspergillus fumigatus* LB39J em meio WB (A) e WBE (B), em fermentador de bancada.

Na Figura 16 é mostrada a variação do pH com o tempo de cultivo. Constatou-se que, a partir de aproximadamente 15 h de cultivo, o pH do meio dos dois cultivos caiu drasticamente e se mantiveram praticamente constantes até 72 h. A partir deste ponto, no cultivo com meio WB os valores apresentaram um leve incremento no final do processo, enquanto que no cultivo com meio WBE, a partir de 70 h de cultivo os valores de pH retornaram a valores próximos a pH 4,0.

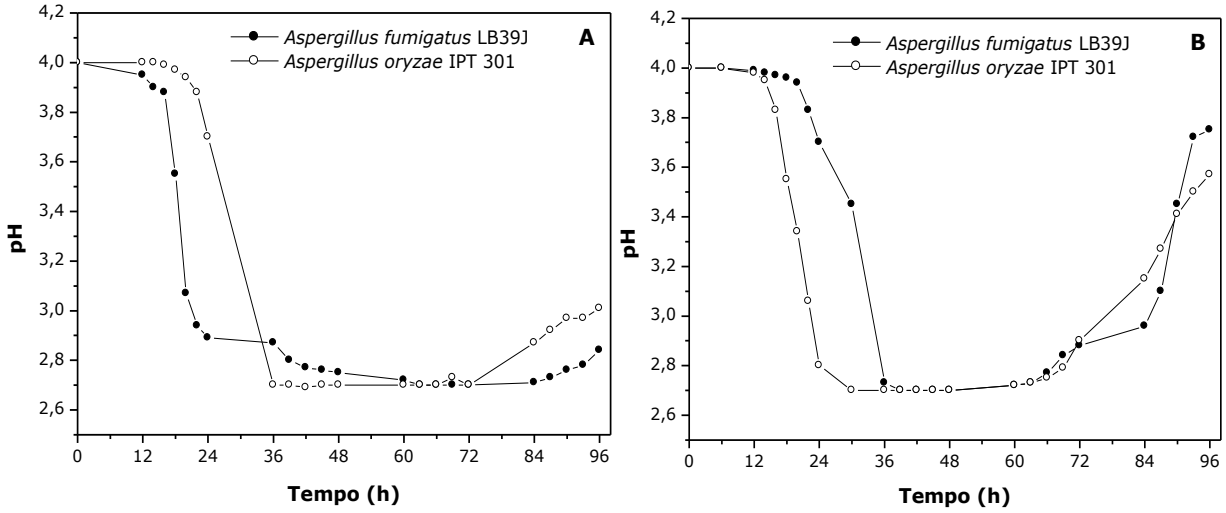


Figura 16. Variação do pH durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus oryzae* IPT 301 e *Aspergillus fumigatus* LB39J em meio WB (A) e WBE (B), em fermentador de bancada.

Na Tabela 8, são resumidos os resultados gerais encontrados nestes ensaios, evidenciando-se a já comentada superioridade da linhagem de referência IPT 301 sobre

LB39J. É interessante ressaltar que com o meio WB foram encontradas as mais altas atividades em endo e exo-PG tanto para o isolado em teste quanto para a linhagem de referência. A presença do farelo de trigo integral neste meio favoreceu a produção das PG possivelmente pela maior disponibilidade de algum nutriente quando comparado ao meio WBE, formulado com o extrato de farelo de trigo. Uma outra hipótese é a maior transferência de oxigênio no meio WB em comparação ao meio WBE em que a solubilidade do oxigênio é afetada em razão da presença da elevada concentração de sólidos dissolvidos (extrato do farelo de trigo) e do aumento na viscosidade. Por outro lado, no meio WBE é possível medir a biomassa fúngica, o que é desejável para estudos em laboratório; entretanto, se o objetivo for a produção de enzimas em maior escala, a melhor alternativa é o meio WB.

Tabela 8. Resultados obtidos nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J e *Aspergillus oryzae* IPT 301 nos meios de cultivo WB e WBE.

	WB		**WBE**	
	***A. fumigatus* LB39J**	***A. oryzae* IPT 301**	***A. fumigatus* LB39J**	***A. oryzae* IPT 301**
$X_{máx}$ (mg/g)	nd	nd	13,75	14,5
$t_{x, máx}$ (h)	nd	nd	42	39
pH $_{PG\ Max}$	3,0	2,8	3,6	3,7
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	nd	nd	0,93	0,76
Endo-$PG_{máx}$ (U/mL)	78	86	53	75
Exo-$PG_{máx}$ (U/mL)	67	73	38	48
$Y_{endo\text{-}PG/RS}$ (U/g^{-1})	28,16	29,45	19,73	25,68
$Y_{exo\text{-}PG/RS}$ (U/g)	24,19	25,00	13,72	16,44
P $_{endo\text{-}PG}$ (U/mL/h)	0,81	0,90	0,55	0,78
P $_{exo\text{-}PG}$ (U/mL/h)	0,70	0,76	0,40	0,50

nd – não determinado
X_{max} - biomassa fúngica máxima
$t_{x, máx}$ – tempo para atingir concentração máxima de células
pH $_{PG\ máx}$ –pH no tempo de atividade máxima de endo e exo-PG
$Y_{X/S}$ – fator de conversão de açúcares redutores totais em células
Endo-$PG_{máx}$– atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
$Y_{exo\text{-}PG,\ endo\text{-}PG}$ – fator de conversão de açúcares redutores totais em endo e exo-PG
P $_{PG}$ – produtividade em endo e exo-PG

4.3.1 Influência do pH e da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J em cultivo submerso

Foi avaliada a influência do pH e da temperatura sobre as poligalacturonases produzidas por *A. fumigatus* LB39J, e comparadas com as poligalacturonases produzidas por *A. oryzae* IPT 301, nas mesmas condições de processo. Pela Figura 17 pode se observar que não há diferença significativa na atividade de endo-PG quando a reação é conduzida em pH 4,0 ou 5,0, sendo esses os melhores valores para a atividade de endo-PG produzida por *A. fumigatus* LB39J. Para atividade em endo-PG produzida por *A. oryzae* IPT 301, foi evidenciado um pico de atividade em valor de pH 4,0, com queda acentuada na atividade quando a reação ocorreu em pH 5,0.

Em comparação com o observado para endo-PG, a resposta da atividade enzimática de exo-PG à variação do pH apresentou uma faixa relativamente larga, entre 4,0 e 6,0, com pico de atividade em 5,0 para a exo-PG produzida por *A. fumigatus* LB39J e 4,0 e 5,0 para a exo-PG produzida por *A. oryzae* IPT 301, concordando com diversos estudos que apontam esta faixa de pH. Malvessi & Silveira (2004), estudando o efeito do pH sobre a exo-PG produzida por *A. oryzae* C, evidenciaram um pico de atividade em pH 4,5. Ueda *et al*. (1982) determinaram o valor de pH 4,0 para a exo-PG produzida por *A. oryzae* A-3 e Tari *et al*. (2008) constataram que o pH 5,0 é o pH ideal para a ação da exo-PG produzida por *A. sojae*. Portanto, é dependente da espécie e da linhagem

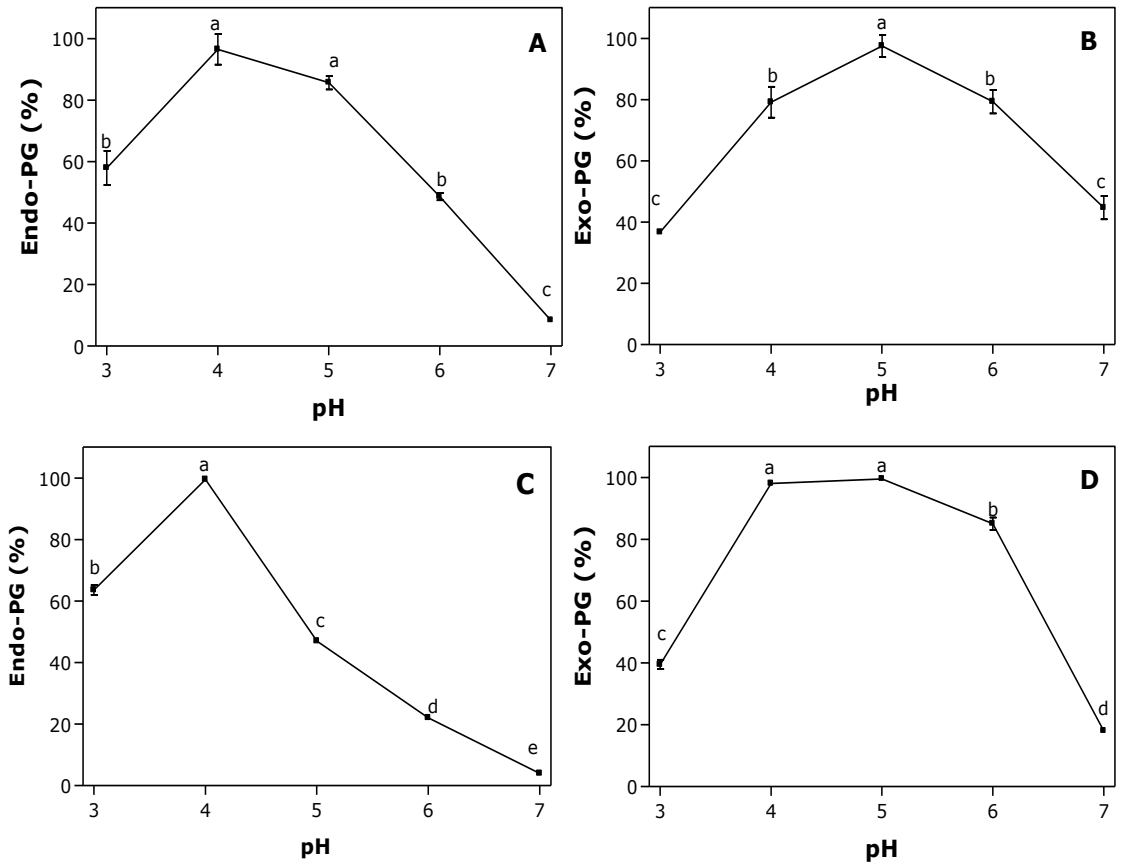


Figura 17. Efeito do pH sobre as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J (A) e (B) e *Aspergillus oryzae* IPT 301 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. Os valores correspondem à média de duplicatas. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$).

Como pode ser observado na Figura 18, maiores atividades foram obtidas nas temperaturas entre 40 e 70°C para a endo-PG produzida pelo *A. fumigatus* LB39J. Com temperatura de 50ºC (máxima atividade), as atividades foram aproximadamente 40% maiores que a observada a 30ºC, temperatura normalmente utilizada para a avaliação da atividade desta enzima.

A resposta da atividade enzimática de endo-PG produzida por *A. oryzae* IPT 301 à variação da temperatura foi claramente mais acentuada, evidenciando-se um pico de atividade a 40°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Malvessi & Silveira (2004) com extrato produzido por *A. oryzae* em cultivo submerso, para o qual verificaram uma temperatura ótima para atividade de endo-PG entre 35 e 40ºC.

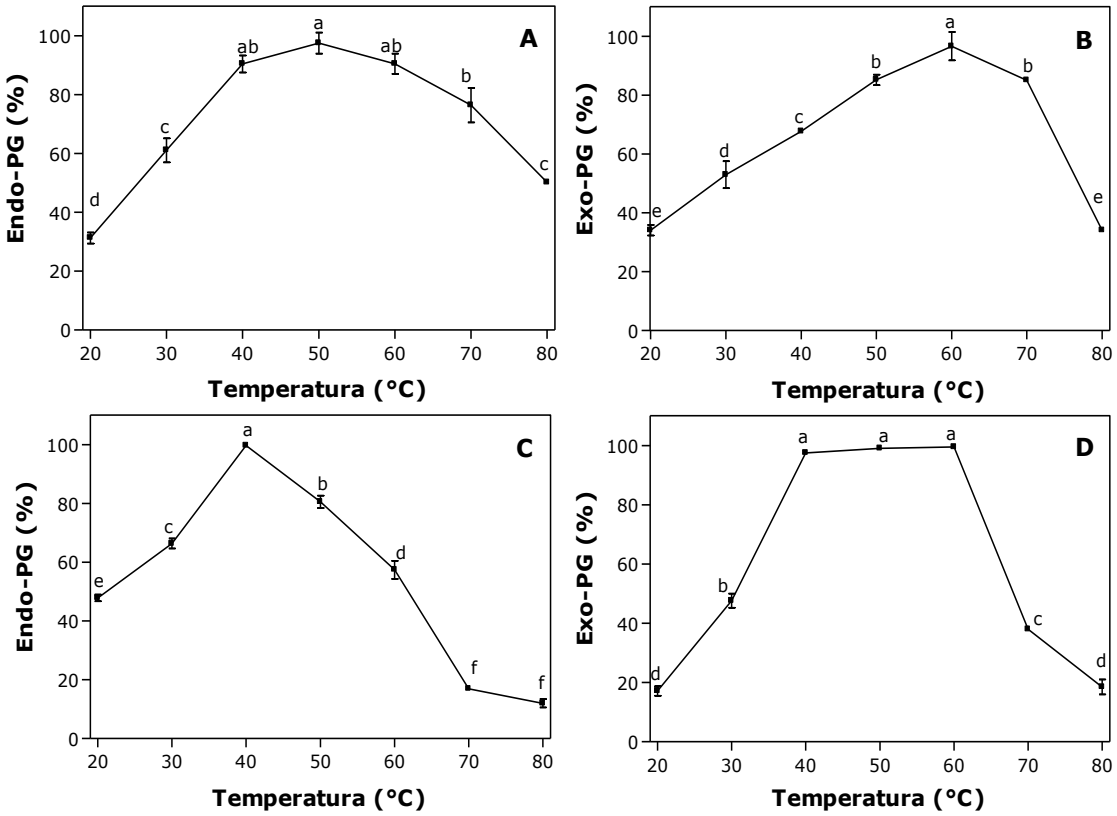


Figura 18. Efeito da temperatura sobre as atividades de endo (A) e exo (B) poligalacturonase, produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J (A) e (B) e *Aspergillus oryzae* IPT 301 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. Os valores correspondem à média de duplicatas. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$).

A atividade de exo-PG produzida *por A. fumigatus* LB39J foi favorecida numa faixa entre 50 e 70°C. Para exo-PG produzida por *A. oryzae* IPT 301 não foi observado diferença significativa na atividade enzimática entre as temperaturas de 40 e 60ºC. Malvessi & Silveira (2004) e Ueda *et al.* (1982) reportaram uma temperatura ótima de 60ºC, para *A. oryzae*, sendo este, também, o limite para a sua estabilidade térmica.

Através da observação dos perfis de estabilidade frente à temperatura com diferentes tempos de pré-incubação do extrato enzimático puro, foi possível constatar que a endo-PG presente no extrato enzimático produzido por *A. fumigatus* LB39J apresenta estabilidade a temperaturas de até 50°C (Figura 19). Com 150 min de exposição a 50ºC, aproximadamente 70% de sua atividade residual foi mantida. Já para endo-PG de *A. oryzae* IPT 301, à temperatura de 50ºC de pré-exposição do caldo de cultivo, foi constatada uma redução de aproximadamente 60% da atividade de endo-PG com apenas 30 minutos de exposição. Maiores atividades residuais foram medidas para a exo-PG presente no extrato enzimático produzido por *A. fumigatus* LB39J quando comparada à exo-PG produzida por *A. oryzae* IPT 301 em temperaturas superiores a 50°C.

De forma geral, maior estabilidade enzimática das PG foi observada quando os caldos enzimáticos brutos foram expostos a temperaturas de 20, 30 e 40ºC, como já discutido anteriormente para os extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens de *Aspergillus* cultivadas em estado sólido.

Os resultados do efeito da temperatura e tempo de pré-incubação sobre as poligalacturonases produzidas pelo *A. fumigatus* LB39J confirmam um ótimo potencial de aplicação industrial destas preparações sob temperaturas relativamente altas, como ocorre frequentemente na indústria de sucos e bebidas.

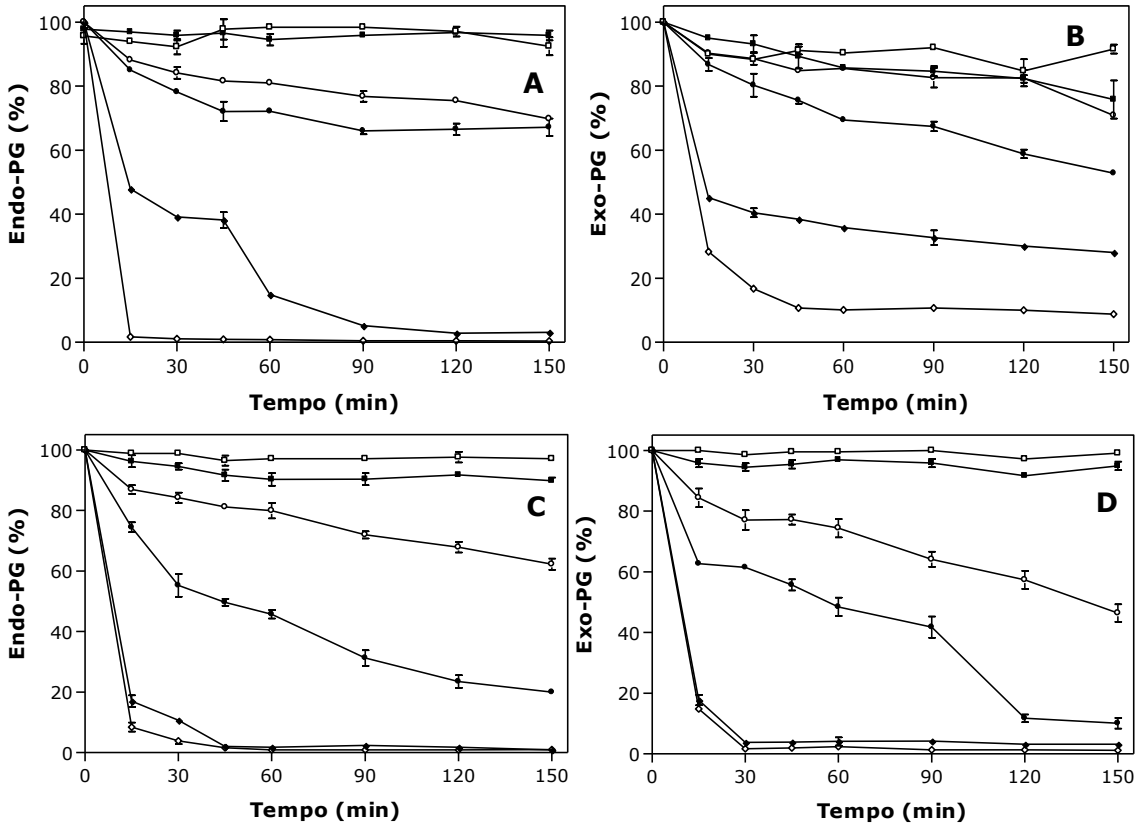


Figura 19. Estabilidade térmica das poligalacturonases produzidas por *Aspergillus fumigatus* LB39J (A) e (B) e *Aspergillus oryzae* IPT 301 (C) e (D), com as demais condições padrão de cada análise. (□) 20°C (■) 30ºC, (○) 40ºC; (●) 50ºC; (♦) 60ºC; (◊) 70ºC.

4.3.2 Influência de glicose, de pectina e do pH inicial do meio sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus fumigatus* LB39J em cultivo submerso

Os ensaios aqui discutidos objetivaram avaliar a influência das concentrações de glicose e de pectina e do pH do meio no cultivo em fermentação submersa por *A. fumigatus* LB39J, em meio WBE, com a finalidade de verificar o comportamento do processo em termos de produção de endo e exo-PG, biomassa fúngica, consumo de açúcares redutores e variação de pH.

Inicialmente, foram testados com concentrações iniciais de glicose de 0 a 30 g/L, em meio com 20 g/L de pectina e com pH inicial 4,0. A fonte de carbono do meio de cultivo possui fundamental importância para o crescimento do microrganismo, uma vez que se apresenta como precursor de cadeias carbônicas para a síntese de todas as estruturas celulares. No entanto, em altas concentrações algumas fontes podem inibir a síntese de enzimas pectinolíticas, como pode ser evidenciado pela Figura 20, onde concentrações de glicose entre 0 e 10% induziram a síntese enzimática e altas concentrações (20, 25 e 30%) apresentaram um efeito repressivo sobre a produção de PG de *A. fumigatus* LB39J, principalmente sobre a endo-PG. Resultados semelhantes foram descritos por Maldonado & Strasser de Saad (1988) no cultivo de *A. niger* em cultivo submerso, em que, conforme os autores, a produção de PG foi fortemente inibida na presença de glicose.

Estes dados indicam que a glicose presente no meio satisfaz as exigências de crescimento do organismo, sendo desnecessária ou mínima a quebra da molécula da pectina, resultando assim em baixa atividade de enzimas pectinolíticas. Porém, na ausência desta, surge a necessidade da quebra da molécula de pectina de modo que possa ser utilizada levando a alta atividade pectinolítica.

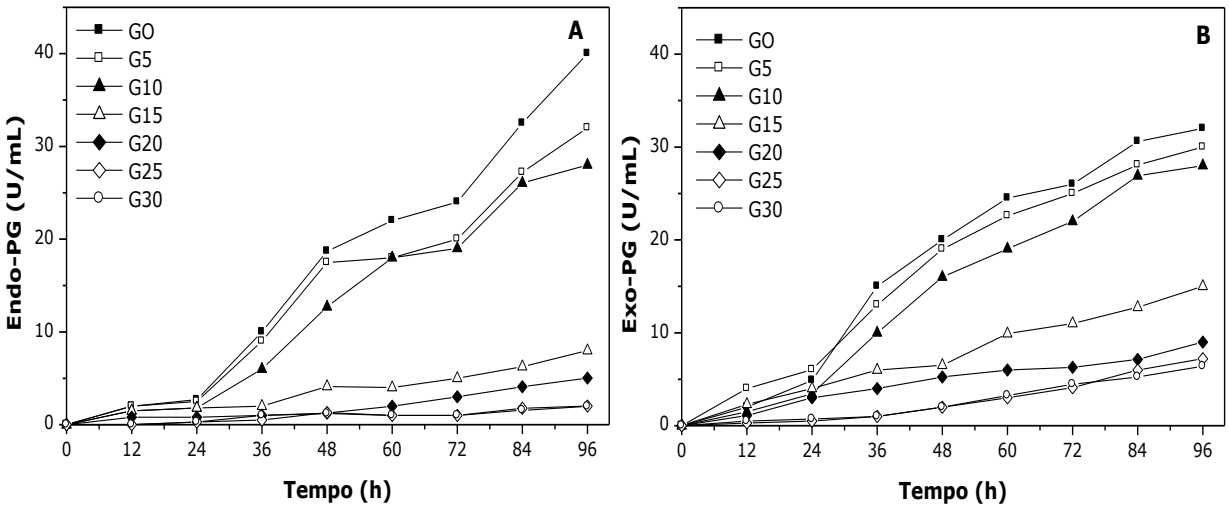


Figura 20. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de glicose**.** G0, G5, G10, G15, G20, G25 e G30– glicose: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% (m/v)

Observa-se pela Figura 21A que até aproximadamente 48 h de processo a concentração de açúcares redutores permanece praticamente constante, em todos os cultivos, com posterior queda na concentração até 96 o final do processo, exceto para o cultivo conduzido sem adição de glicose, onde a concentração de açúcares redutores quase não sofreu variação durante o cultivo, neste ensaio o consumo de açúcares redutores está relacionado à quebra do amido presente do farelo de trigo. A queda de açúcares, observado nos demais ensaios, é decorrente do crescimento celular, mas quando a concentração de açúcares é limitante, como por exemplo, no ensaio sem glicose, o microrganismo reduz sua velocidade de crescimento e começa a produção de PG (Fawole & Odunfa, 2003).

Atividades de endo e exo-PG podem estar relacionadas ao também pH, sendo que nos ensaios com 0 e 5 g/L de glicose, estes valores apresentaram menor decréscimo durante o processo, com um leve aumento ao final do cultivo. Quando foram utilizadas concentrações de glicose superiores a 10 g/L, os valores de pH decresceram para 1,5, mantendo-se assim até o final do processo (Figura 21B).

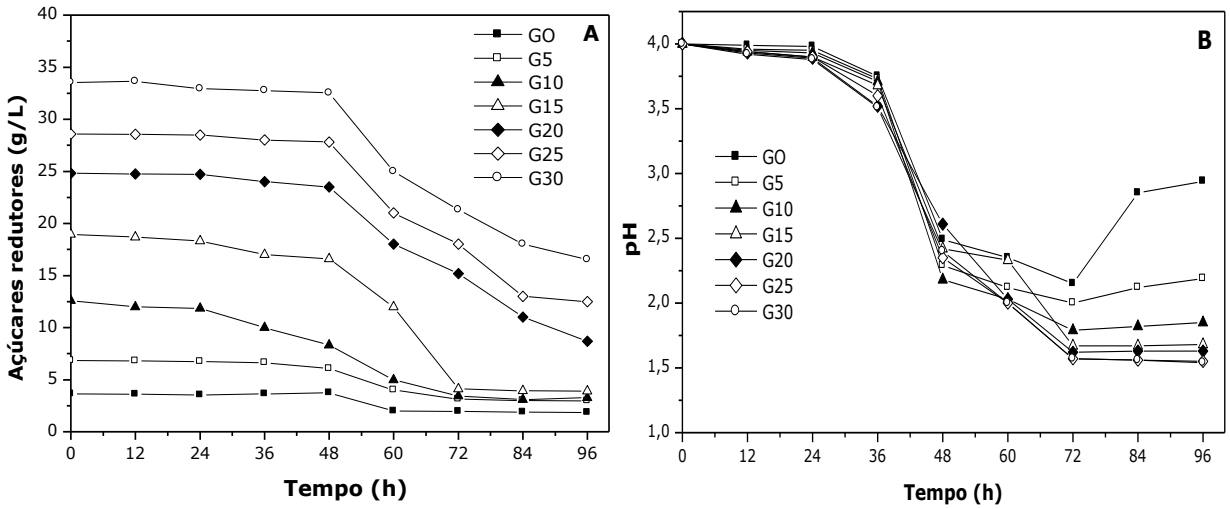


Figura 21. Variação do consumo de açúcares redutores (A) e pH (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de glicose. G5, G10, G15, G20, G25 e G30– glicose: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% (m/v)

Observa-se pela Figura 22 que a adição de glicose ao meio, particularmente em concentração igual ou acima de 10 g/L, resultou em maior crescimento celular, como já foi reportado por Taragano *et al* (1997), para o cultivo de *A. niger* e por Fontana *et al*. (2009), em estudos com *A. oryzae*.

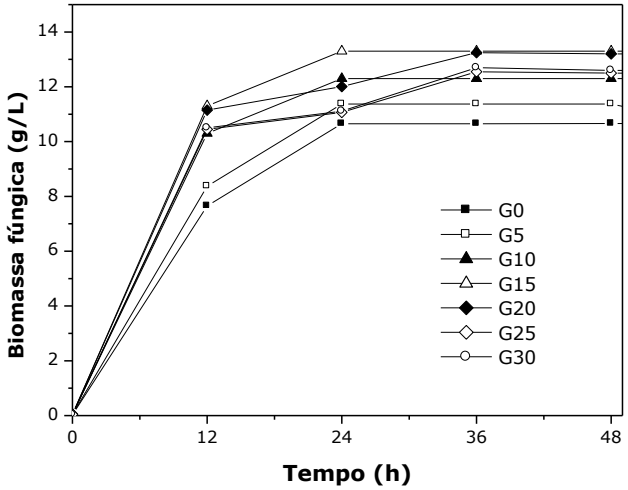


Figura 22. Variação da biomassa fúngica (X) durante 48 h do cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes concentrações glicose. G5, G10, G15, G20, G25 e G30– glicose: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% (m/v)

Na Tabela 9, são resumidos os resultados gerais encontrados nos cultivos submersos de *A. fumigatus* LB39J com concentrações de glicose de 0 a 30 g/L e com 20 g/L de pectina. Como pode ser visto ao confrontar-se a concentração de açúcar redutor

residual com a atividade máxima, fica evidente a ocorrência de repressão pela glicose sobre a produção de poligalacturonases.

Tabela 9. Resultados obtidos no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de glicose.

	G0	**G5**	**G10**	**G15**	**G20**	**G25**	**G30**
S_0 (g/L)	3,7	6,8	12,6	19,0	24,8	28,6	33,5
S_{cons} (g/L)	1,8	3,0	3,3	3,9	8,7	12,5	16,5
X_{max}	10,7	11,4	12,3	13,3	13,3	12,6	12,7
$t_{x, máx}$	24	24	24	24	24	36	36
pH_{min}	2,15	2,0	1,79	1,67	1,62	1,57	1,57
pH_{final}	2,9	2,2	1,8	1,7	1,6	1,5	1,5
Endo-PG_{max} (U/mL)	40	32	28	8,0	5,0	2,0	2,0
Exo-PG_{max} (U/mL)	32	30	28	15	9,0	7,2	6,4

S_0 – concentração inicial de substância redutora (expressas em glicose)
S_{cons}– concentração final de substância redutora (expressas em glicose)
X_{max} - biomassa fúngica máxima
$t_{x, máx}$ - tempo para atingir concentração máxima de células
pH_{min} – mínimo valor de pH
pH_{final} – valor do pH após 96 h de cultivo
Endo-$PG_{máx}$– atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
G0, G5, G10, G15, G20, G25 e G30– glicose: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% (m/v)

Posteriormente, foram avaliadas diferentes concentrações de pectina (0, 10 e 20 g/L), em meio isento de glicose, em pH inicial de 4,0. As variações das atividades de endo e exo-PG, valores de pH e a concentração de açúcares redutores destes ensaios são apresentadas na Figura 23.

Observa-se que no meio formulado sem pectina a produção de PG foi praticamente nula, indicando que a produção enzimática por este microrganismo é dependente da presença da pectina, comportamento muito diferente do observado no cultivo em estado sólido de *A. niger* LB23, em que, aparentemente, a pectina naturalmente presente no farelo de trigo satisfez, pelo menos parcialmente, a necessidade do fungo. Concentrações crescentes de pectina levaram, por outro lado, à produção crescente de PG, comprovando a necessidade deste indutor na formação da enzima. Possivelmente, concentrações maiores que de pectina poderia resultar em maiores atividades enzimáticas; entretanto, já foi evidenciado que quanto maior a concentração de pectina no meio de cultivo, menor é a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida em razão do significativo aumento da viscosidade, o que afeta negativamente a produção enzimática (Fontana *et al.* 2009).

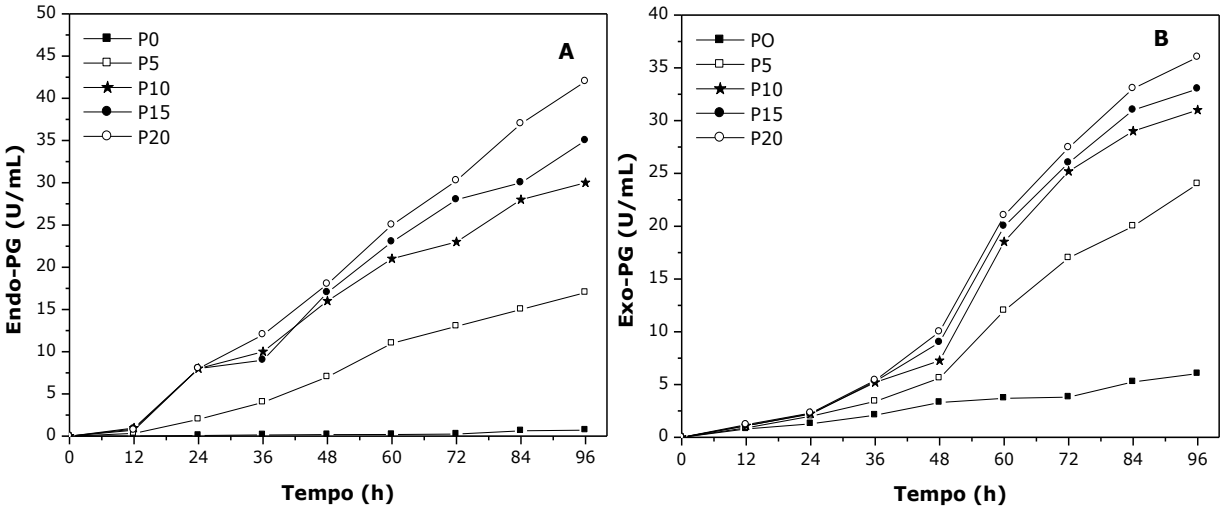


Figura 23. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de pectina. P0, P5, P10, P15 e P20 – pectina: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/v)

No meio isento de pectina, a concentração de açúcares redutores se manteve estável durante as primeiras 24 h de cultivo. Verificou-se, após este tempo, um decréscimo na concentração até 60 h do processo e, posteriormente, valores praticamente constantes. Para os meios formulados com 10, 15 e 20 g/L de pectina, a concentração de açúcares redutores aumentou entre 12 e 24 h de processo, com queda em 48 e 60 h de processo, respectivamente (Figura 24A). Sugere-se que variação de açúcares redutores no início do processo (entre os diferentes ensaios), é decorrente da presença da pectina, que pode ter causado interferência na análise. No decorrer do processo, maiores valores de açúcares redutores foram verificados nos meios formulados com maiores concentrações de pectina, provavelmente em razão da presença de açúcares redutores provenientes da hidrólise da pectina.

Pela Figura 24B, observa-se que em 72 h de processo os meios com maiores concentrações de pectina (15 e 20%) apresentaram os menores valores de pH, condição que pode ter favorecido a formação das poligalacturonases.

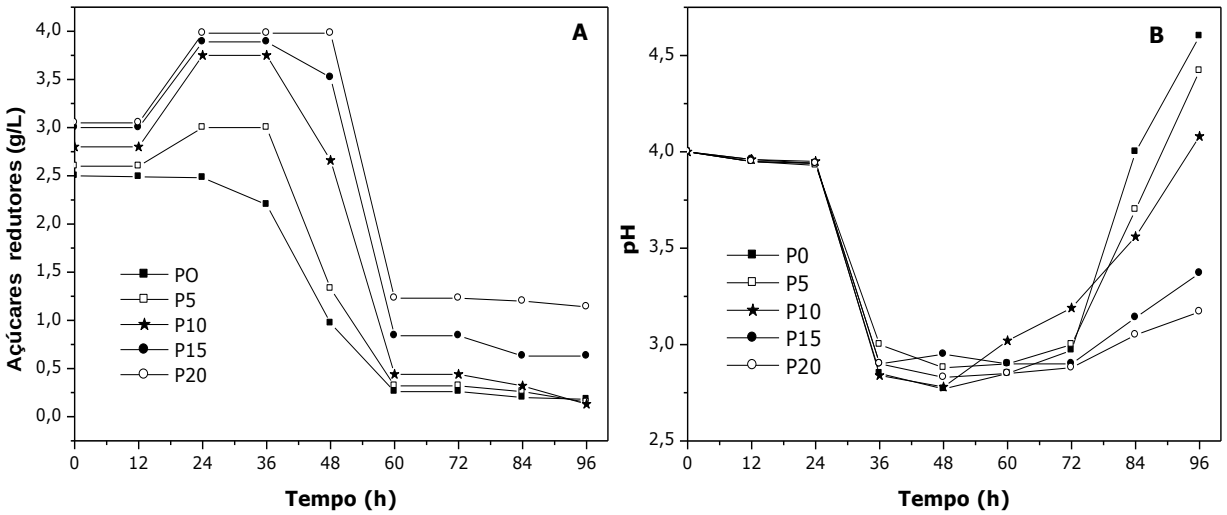


Figura 24. Variação do consumo de açúcares redutores (A) e pH (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de pectina. P0, P5, P10, P15 e P20 – pectina: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/v)

Os cultivos com 10, 15 e 20% de pectina no meio apresentaram as maiores concentrações de biomassa fúngica quando comparados aos meios com 0 e 5% de pectina. (Figura 25), ou seja, a pectina não induziu somente a produção enzimática, mas favoreceu também o crescimento celular.

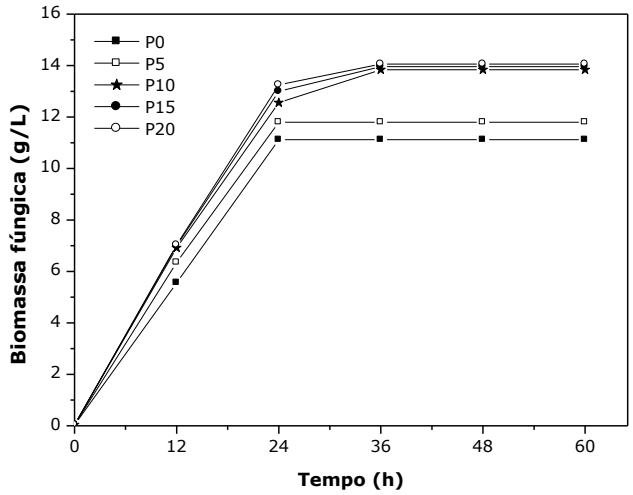


Figura 25. Variação da biomassa fúngica (X) durante 48 h do cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes concentrações pectina. P0, P5, P10, P15 e P20 – pectina: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/v)

Na Tabela 10 são resumidos os resultados gerais encontrados nos cultivos submersos de *A. fumigatus* LB39J com concentrações de pectina de 0, 10 e 20 g/L em meio isento de glicose. Como já mencionado, fica evidente que a presença de pectina no meio de cultivo afeta positivamente a produção das duas enzimas.

Tabela 10. Resultados obtidos no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes concentrações de pectina.

	P0	**P5**	**P10**	**P15**	**P20**
S_0 (g/L)	2,5	2,6	2,8	3,0	3,05
S_{cons} (g/L)	0,18	0,15	0,13	0,63	1,14
X_{max}	11,1	11,8	13,8	13,96	14,1
$t_{x, max}$	24	24	36	36	36
pH_{min}	2,77	2,88	2,78	2,9	2,83
pH_{final}	4,6	4,42	4,08	3,37	3,17
Endo-PG_{max} (U/mL)	0,7	17	30	35	42
Exo-PG_{max} (U/mL)	6,0	24	31	33	36

S_0 – concentração inicial de substância redutora (expressas em glicose)
S_{cons}– concentração final de substância redutora (expressas em glicose)
X_{max} - biomassa fúngica máxima
$t_{x, máx}$ - tempo para atingir concentração máxima de células
pH_{min} – mínimo valor de pH
pH_{final} – valor do pH após 96 h de cultivo
Endo-$PG_{máx}$– atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
P0, P5, P10, P15 e P20 – pectina: 0, 5, 10, 15 e 20% (m/v)

Adicionalmente, foram avaliados diferentes valores de pH iniciais (3,0 a 7,0) em meios formulados sem glicose e com 20 g/L de pectina. Os resultados são mostrados na Figura 26, evidenciando-se que as máximas atividades de endo-PG foram obtidas com 96 h de cultivo, independentemente do valor de pH inicial do meio. Os valores de pH iniciais na faixa 5-7 apresentaram um efeito negativo sobre a síntese das poligalacturonase, principalmente sobre na formação da endo-PG. Máximas atividades de endo-PG foram obtidas em pH inicial 3,0 (44 U/ml) e 4,0 (42 U/mL). Em valores iniciais de pH de 5,0, 6,0 e 7,0, observaram-se resultados inexpressivos de atividade enzimática. Malvessi & Silveira avaliando a influência do pH sobre as poligalacturonas produzidas por *A. oryzae*, observaram que os valores iniciais de pH de 5,0, 6,0 e 7,0 também afetaram a síntese enzimática da endo-PG. Os autores sugerem que os valores de pH atingidos a partir de 96 h, próximos à neutralidade, tenham favorecido a ação de enzimas proteolíticas alcalinas que destruiriam as pectinases. Entretanto, o mesmo não pode ser concluído no presente estudo, visto que os valores de pH determinados em 96 foram menores que 5,0, exceto para o meio com pH inicial 7,0.

Para exo-PG, máximas atividades foram obtidas com 96 h de processo em meio com pH inicial 4,0 (37 U/mL), com uma ligeira queda na atividade em meio com pH 3,0 (33 U/mL). Observa-se que os valores de pH 5,0, 6,0 e 7,0 levaram a títulos enzimáticos menores, mas a redução não foi tão drástica como observada para endo-PG. Ueda *et al.*

(1982) relataram que variações no pH do meio de cultura provocam alterações no tipo, na quantidade e no tempo de produção de PG de *A. oryzae*.

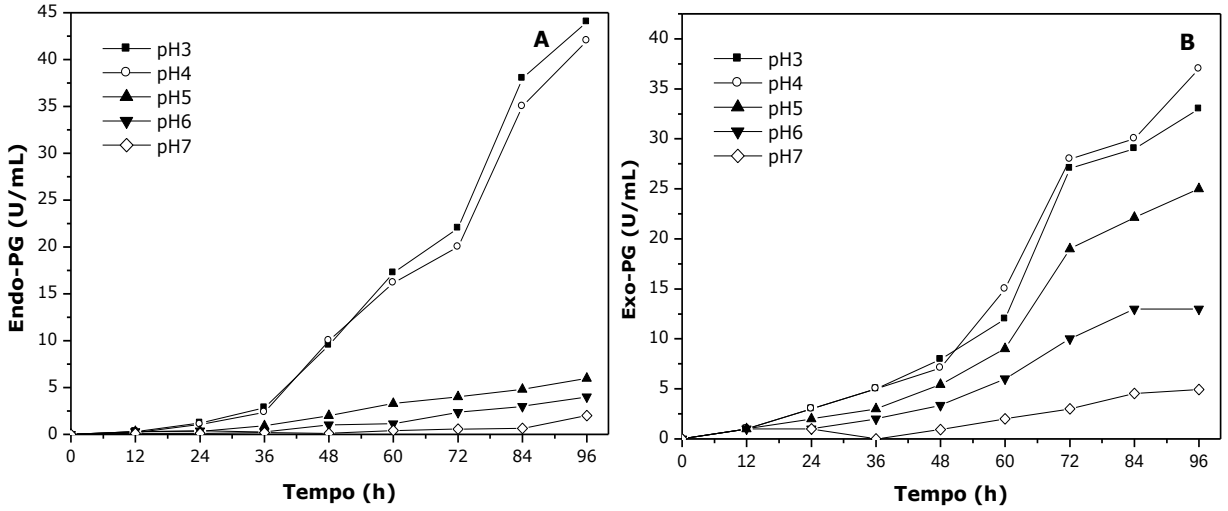


Figura 26. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes valores de pH iniciais do meio. pH3, pH 4, pH5, pH6 e pH7 – valores de pH inicias do meio

A Figura 27 apresenta a variação do consumo de açúcares redutores e valores de pH durante o processo.

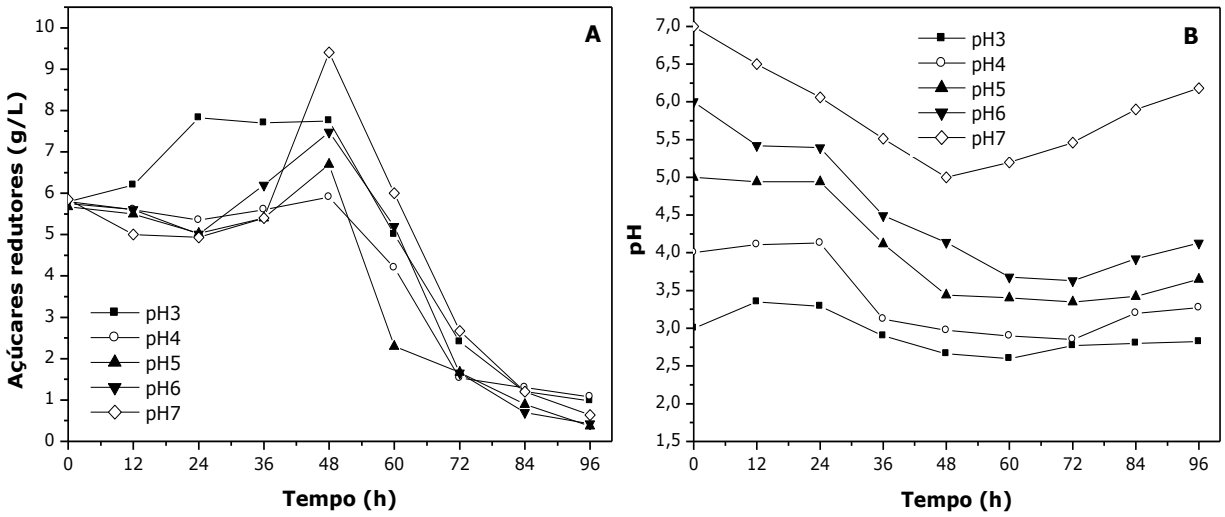


Figura 27. Variação do consumo de açúcares redutores (A) e valores de pH (B) durante o processo, nos cultivos submersos de o *Aspergillus fumigatus* LB39J, com diferentes valores de pH iniciais do meio. pH3, pH 4, pH5, pH6 e pH7 – valores de pH inicias do meio

Com relação ao consumo de açúcares redutores, foi observado perfis distintos entre os ensaios, no cultivo com pH inicial 3 foi constatado um aumento na concentração a partir de 12 de processo, enquanto que nos demais ensaios a concentração de açúcares

redutores apresentou uma leve queda, em comum, foi verificado um acúmulo de açúcares redutores em 48 h, com posterior queda nos valores em decorrência ao crescimento celular (Figura 27). Pela Figura 27B, observa-se que os valores dos pH apresentaram o mesmo comportamento, exceto com o meio com pH inicial 7,0, em que, a partir de 48 h, constatou-se aumento nos valores até o fim do processo.

Na Tabela 11, são mostrados os resultados gerais encontrados nos cultivos submersos de *A. fumigatus* LB39J com diferentes valores de pH iniciais (3,0 a 7,0), em meio com 20 g/L de pectina e isento de glicose. Assim como para os ensaios com diferentes concentrações de glicose, constatou-se que as condições que favoreceram o crescimento celular apresentaram um efeito negativo sobre a síntese enzimática, confirmando que nem sempre o meio que proporciona o maior crescimento celular, favorece a produção enzimática.

Tabela 11. Resultados obtidos no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J com diferentes valores de pH iniciais.

	pH3	**pH4**	**pH5**	**pH6**	**pH7**
S_0 (g/L)	5,8	5,8	5,7	5,8	5,9
S_{cons} (g/L)	1,0	1,1	0,4	0,4	0,6
X_{max}	13,2	13,3	13,7	13,9	14,0
$t_{x,\ max}$	36	36	24	24	24
pH_{min}	2,6	2,9	3,4	3,68	5,2
pH_{final}	2,82	3,27	3,65	4,13	6,18
Endo-PG_{max} (U/mL)	44	42	4,8	2,4	0,7
Exo-PG_{max} (U/mL)	33	37	22	13	4,6

S_0 – concentração inicial de substância redutora (expressas em glicose)
S_{cons}– concentração final de substância redutora (expressas em glicose)
X_{max} - biomassa fúngica máxima
$t_{x,\ máx}$ - tempo para atingir concentração máxima de células
pH_{min} – mínimo valor de pH
pH_{final} – valor do pH após 96 h de cultivo
Endo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de endo-PG
Exo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
pH3, pH 4, pH5, pH6 e pH7 – valores de pH inicias do meio

Os testes com diferentes concentrações de pectina e glicose e valores de pH do meio permitem concluir que a concentração de pectina de 20 g/L e pH inicial de 3,0 e 4,0 favoreceram a produção das poligalacturonases. Com respeito à glicose, entretanto, *A. fumigatus* LB39J apresentou um comportamento diferente em comparação aos relatos da literatura, já que, para este fungo, a glicose foi prejudicial à produção de endo-PG.

As melhores condições definidas em ensaios em frascos foram avaliadas em fermentador de bancada nas seguintes condições: pH inicial 3,0 e sem controle durante o

processo (F1); pH inicial 4,0 e sem controle durante o processo (F2); pH inicial 4,0, com valor mínimo sem controle e, após, com o máximo controlado em 3,5 (F3). Os três ensaios foram conduzidos em meio isento de sólidos em suspensão (WBE).

Verificou-se que a condição que proporcionou a maior produção enzimática em termos de endo-PG foi a F3 (81 U/mL), seguindo-se F1 (74 U/mL) e a F2 (58 U/mL). Em termos de exo-PG, a melhor condição também foi a F3 (49 U/mL), seguida pelas condições sem controle de pH durante o processo; entretanto, diferentemente do que foi observado para a produção da endo-PG, melhores resultados foram determinados em pH inicial 4,0 (43 U/mL), condição F2, e não 3,0 (39 U/mL), condição F1 (Figura 28).

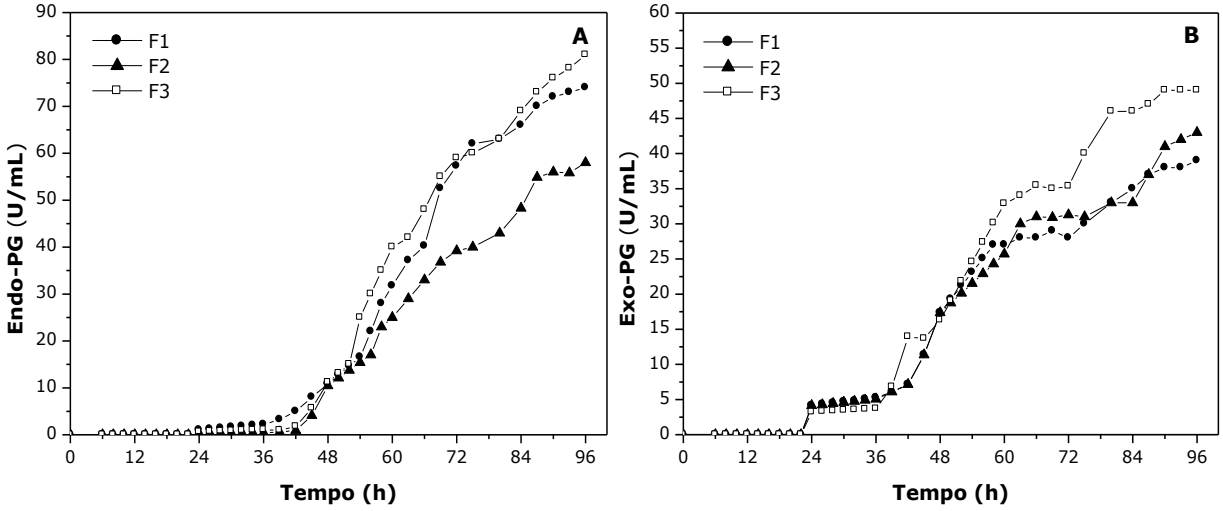


Figura 28. Variação da atividade de endo (A) e exo (B) poligalacturonase durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, em fermentador de bancada.

Na Figura 29, são mostradas as variações do pH e da concentração de oxigênio dissolvido durante os três ensaios. Os valores de pH apresentaram o mesmo perfil, com uma queda após 24 h e recuperação nos valores entre 48 e 60 h de processo. Ao final do processo, em 96 h, os valores do pH do meio apresentaram valores distintos; o ensaio F2 apresentou o valor de pH mais elevado (4,9), seguido das condições F3 (3,5) e F1 (2,5).

A concentração de oxigênio dissolvido durante o processo decresceu após a fase "lag" em razão do intenso metabolismo microbiano e após aproximadamente 36 h verificou-se valores praticamente constantes até o final do processo.

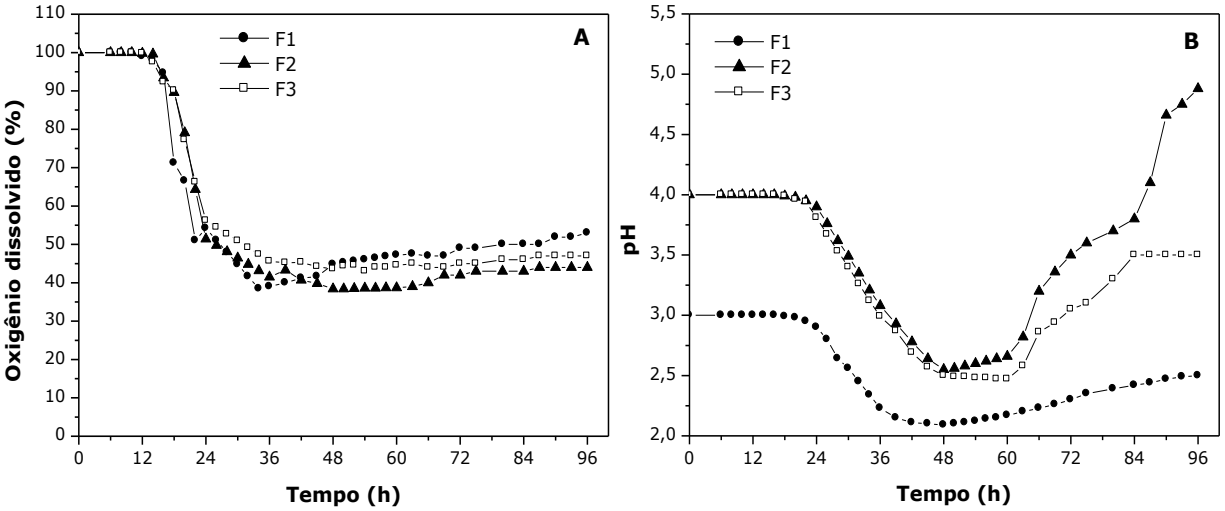


Figura 29. Variação do oxigênio dissolvido (A) e pH (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, em fermentador de bancada.

A variação da biomassa fúngica e de açúcares redutores durante no cultivo de *A. fumigatus* LB39J, com as condições F1, F2 e F3 são apresentadas na Figura 30. Após iniciado, o crescimento celular passou a apresentar um perfil linear em relação ao tempo. O consumo de açúcares redutores foi gradual até 45 h de processo, seguindo-se um período com concentrações residuais constantes, para as três condições avaliadas. Após uma fase "lag", o crescimento celular passou a apresentar um perfil linear em relação ao tempo, acompanhado pelo decréscimo do pH. A partir de cerca de 45 h de processo, observou-se uma forte redução da velocidade de crescimento, com o cultivo tendendo a entrar na fase estacionária, fato também evidenciado pelo decréscimo da demanda de oxigênio.

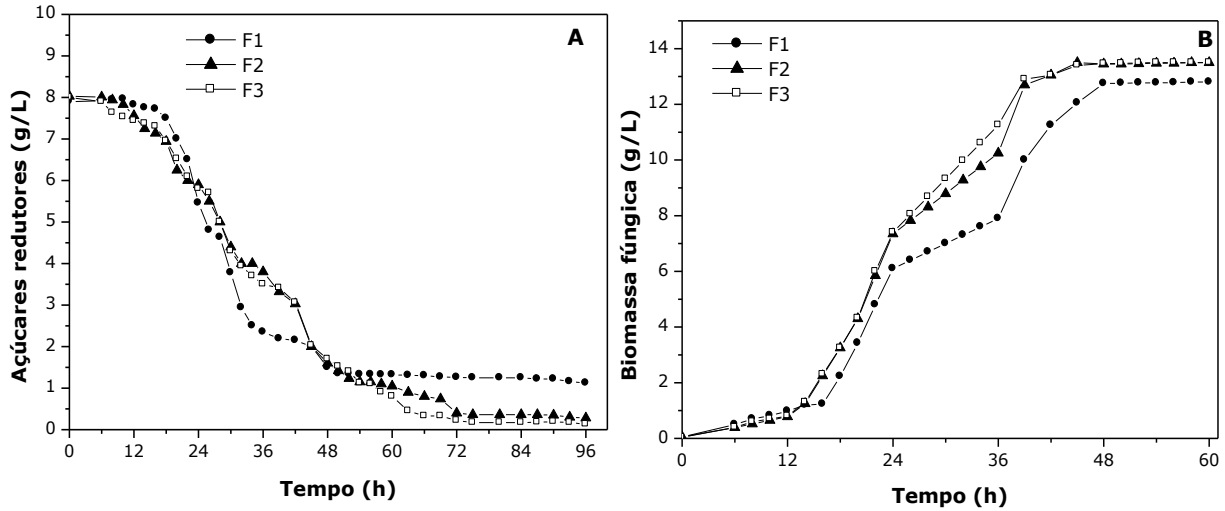


Figura 30. Variação das concentrações de açúcares redutores (A) e biomassa fúngica (B) durante o processo, no cultivo submerso de *Aspergillus fumigatus* LB39J, em fermentador de bancada.

Comparando-se os resultados em termos das atividades de PG apresentadas na Tabela 12 com os mostrados na Tabela 11, conclui-se que, além do pH inicial, o controle deste parâmetro durante o processo é fundamental para uma eficiente produção enzimática, especialmente de endo-PG.

Tabela 12. Resultados obtidos nos cultivos submersos de *Aspergillus fumigatus* LB39J em fermentador de bancada.

	pH inicial 3,0 sem controle	pH inicial 4,0 sem controle	pH inicial 4,0,controle em 3,5
$X_{máx}$ (mg/g)	12,8	13,5	13,5
$t_{x, máx}$ (h)	48	45	48
pH $_{Endo\text{-}PG\ máx}$	2,5	4,9	3,5
$Y_{X/S}$ (mg/mg^{-1})	2,1	2,7	2,6
Endo-PG $_{máx}$ (U/mL)	74	58	81
Exo-PG $_{máx}$ (U/mL)	39	43	49
$Y_{endo\text{-}PG/RS}$ (U/g)	12,3	11,7	15,4
$Y_{exo\text{-}PG/RS}$ (U/g)	6,5	9,3	9,3
P $_{endo\text{-}PG}$ (U/mL/h)	0,77	0,60	0,84
P $_{exo\text{-}PG}$ (U/mL/h)	0,41	0,45	0,51

X_{max} - biomassa fúngica máxima
$t_{x, máx}$ – tempo para atingir concentração máxima de células
pH–pH no tempo de atividade máxima de endo e exo-PG
$Y_{X/S}$ – fator de conversão de açúcares redutores totais em células
Endo-$PG_{máx}$ – atividade máxima de endo-PG
Exo-P $_{máx}$ – atividade máxima de exo-PG
$Y_{exo\text{-}PG,\ endo\text{-}PG}$ – fator de conversão de açúcares redutores totais em endo e exo-PG
P $_{PG}$ – produtividade em endo e exo-PG

4.4 Uso de pectinases fúngicas no tratamento de sucos de frutas

Com base na Tabela 13, que mostra a temperatura e o pH ideal para ação da endo-PG presente nos extratos enzimáticos experimentais produzidos por *A. niger* T0005007-2 (TE1), *A. oryzae* IPT 301 (TE2), *A. niger* LB23 (TE3) e *A. fumigatus* LB39 (TE4) e nas preparações comerciais Pectinex®Clear (PC) e Pectinex®Be Colour (PB) foram fixados as temperaturas de 40 e 50°C para a hidrólise enzimática. O tempo de hidrólise enzimática foi fixado em 60 minutos e a atividade enzimática em 1,0 unidade (U) de endo-PG por mL de suco.

Tabela 13. Temperatura e pH ideal para ação da endo-PG presente nos extratos enzimáticos experimentais e nas preparações comerciais.

	Temperatura (°C)	**pH**
Extrato enzimático obtido por *A. niger* T000507-2	50	4,0
Extrato enzimático obtido por *A. oryzae* IPT 301	40	4,0
Extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23	40-50	4,0
Extrato enzimático obtido por *A. fumigatus* LB39	40-50-60	4,0-5,0
Pectinex®Clear	40	5,0
Pectinex®Be Colour	40	5,0

As pectinas, quando em solução aquosa, podem tornar o meio altamente viscoso, mesmo quando em baixas concentrações, dependendo do seu grau de metoxilação (Löfgren & Hermansson, 2007). O tratamento enzimático de degradação da pectina ocasiona redução na capacidade de retenção de água; portanto, mais água livre é liberada para o sistema, reduzindo a viscosidade dos sucos, como pode ser evidenciado na Figura 31, com destaque para o extrato enzimático experimental produzido por *A. niger* LB23 (TE3) que reduziu 40 e 60% da viscosidade dos sucos de maçã e mirtilo, respectivamente.

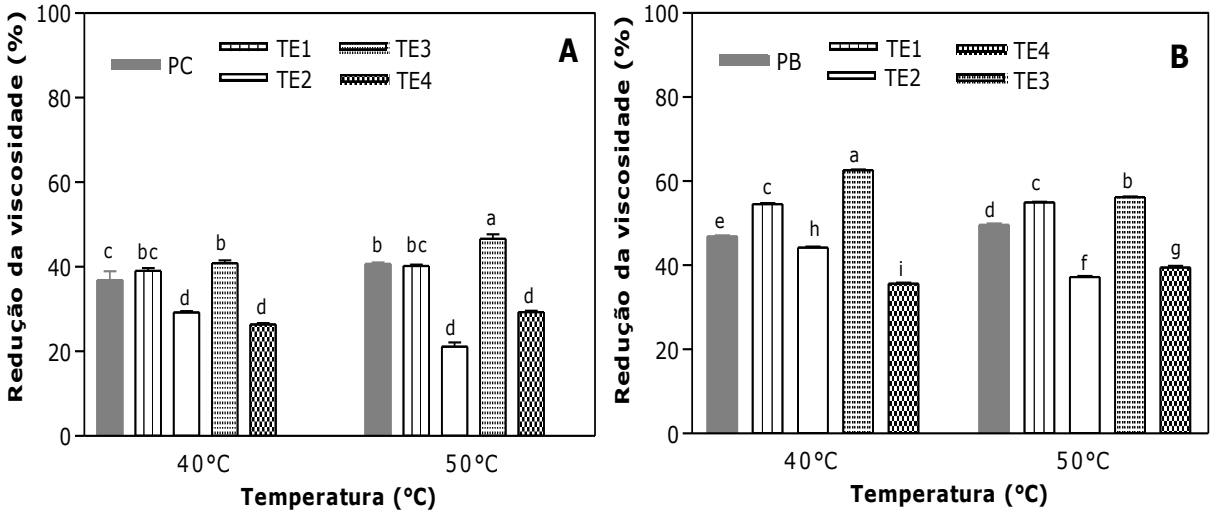


Figura 31. Redução da viscosidade dos sucos de maçã (A) e mirtilo (B), utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação, nas temperaturas de 40 e 50°C, com diferentes tratamentos enzimáticos. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$). PC, Pectinex®Clear; PB, Pectinex®Be Colour; TE1, extrato enzimático obtido por *A. niger* T000507-2; TE2, extrato enzimático obtido por *A. oryzae* IPT 301; TE3, extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23 e TE4, extrato enzimático obtido por *A. fumigatus* LB39J.

As pectinases hidrolisam a pectina, levando à floculação de complexos pectina-proteína (Lee *et al*. 2006), que posteriormente podem ser são removidos por centrifugação, resultando em sucos com reduzido teor de macromoléculas e menor turbidez. Na Figura 32, é evidenciada a ação da hidrólise enzimática sobre as substâncias pécticas e seu efeito na redução da turbidez. Novamente, pode-se destacar a eficiência do extrato experimental TE3 na redução da turbidez dos sucos. Para o suco de maçã, com redução de aproximadamente 90% da turbidez, com temperaturas de 40 e 50ºC, enquanto que para o suco de mirtilo, a redução da turbidez foi de 40% a 40ºC. Este resultado é semelhante ao descrito por Landbo & Meyer (2007), que observaram uma redução de 30% na turbidez do suco de mirtilo com adição da preparação comercial Pectinex®Be.

Na Figura 33 é ilustrada a ação hidrolítica das preparações pectinolíticas em teste sobre as substâncias pécticas e seu efeito na clarificação. Há uma relação direta entre a redução da turbidez com o aumento da clarificação de todos os sucos, como já constatado por Lee *et al*. (2006) e Abdullah *et al*. (2007). Assim como para a redução da viscosidade e turbidez, o extrato enzimático experimental produzido por *A. niger* LB23 (TE3) mostrou-se eficiente no aumento da clarificação dos sucos, principalmente para o suco de maçã, para o qual o aumento na clarificação foi de aproximadamente 90%.

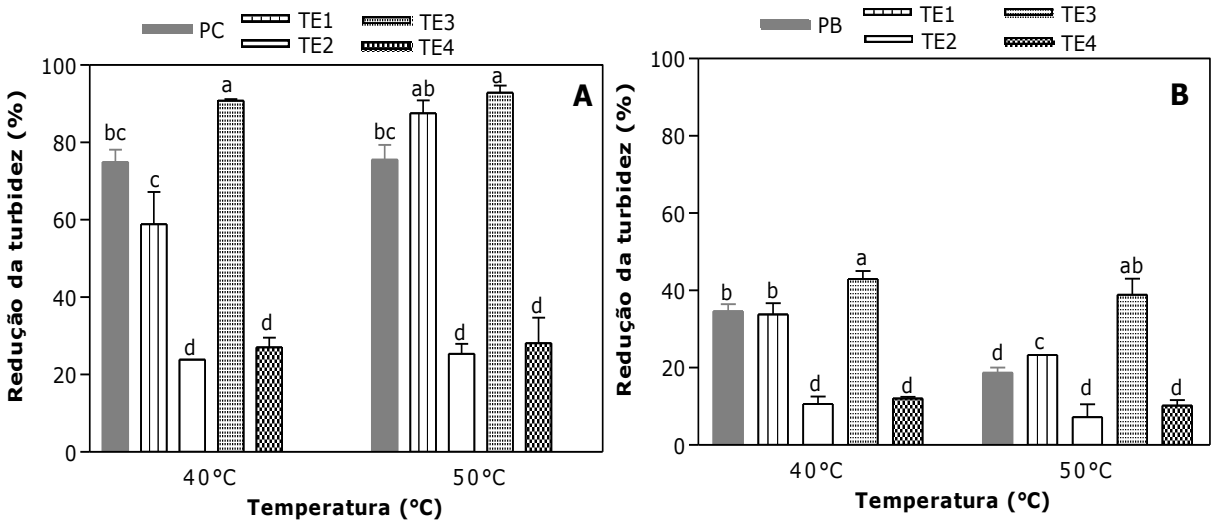


Figura 32. Redução da turbidez (%) dos sucos de maçã (A) e mirtilo (B), utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação, nas temperaturas de 40 e 50°C, com diferentes tratamentos enzimáticos. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$). PC, Pectinex®Clear; PB, Pectinex®Be Colour; TE1, extrato enzimático obtido por *A. niger* T000507-2; TE2, extrato enzimático obtido por *A. oryzae* IPT 301; TE3, extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23 e TE4, extrato enzimático obtido por *A. fumigatus* LB39J.

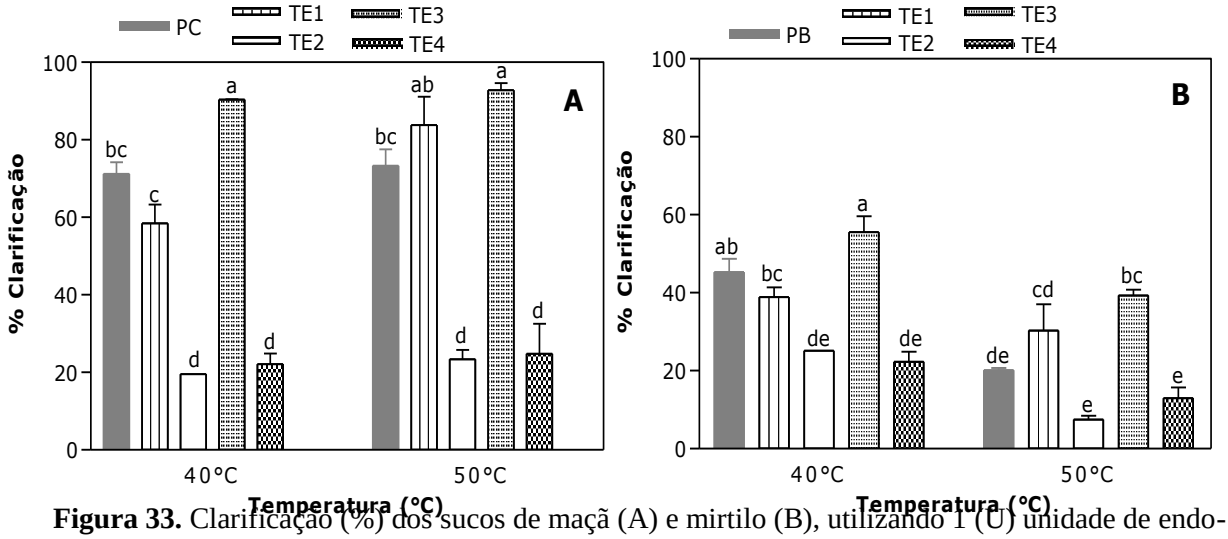


Figura 33. Clarificação (%) dos sucos de maçã (A) e mirtilo (B), utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação, nas temperaturas de 40 e 50°C, com diferentes tratamentos enzimáticos. Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$). PC, Pectinex®Clear; PB, Pectinex®Be Colour; TE: tratamentos enzimáticos experimentais: TE1, extrato enzimático obtido por *A. niger* T000507-2; TE2, extrato enzimático obtido por *A. oryzae* IPT 301; TE3, extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23 e TE4, extrato enzimático obtido por *A. fumigatus* LB39J.

A partir dos valores determinados nos tratamentos enzimáticos, foi possível estimar, por regressão linear, a correlação entre a redução da turbidez, redução da viscosidade e aumento da clarificação. Como comentado anteriormente, existe maior correlação entre a redução da turbidez e o aumento da clarificação do que entre a redução da viscosidade e o aumento da clarificação, e/ou entre a redução da viscosidade e a redução

da turbidez, principalmente para o suco de mirtilo (Tabela 14).

Tabela 14. Correlação (R^2) entre a redução da turbidez, viscosidade e aumento da clarificação dos sucos de maçã e mirtilo.

	Suco de maçã	**Suco de mirtilo**
Aumento da clarificação (%) *versus* redução da turbidez (%)	R^2= 0,9993	R^2= 0,9989
Aumento da clarificação (%) *versus* redução da viscosidade (%)	R^2= 0,9882	R^2= 0,9249
Redução da turbidez (%) *versus* redução da viscosidade (%)	R^2= 0,9897	R^2= 0,9285

Analisando-se as Figuras 31 a 33, observa-se que os melhores resultados foram obtidos com o extrato experimental TE3 seguido do TE1, ambos obtidos em cultivo em estado sólido. A eficiência de TE1 na hidrólise enzimática já havia sido constatada anteriormente (dados não apresentados); entretanto, pode-se afirmar que TE3 (extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23) apresenta maior eficiência na degradação das substâncias pécticas.

A Figura 34 ilustra o efeito do tratamento enzimático nos sucos de maçã e mirtilo, com temperatura de 40°C. Pode-se evidenciar a eficácia do extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23 (TE3) e por *A. niger* T000507-2 (TE1), como já observado anteriormente. Já os extratos enzimáticos experimentais obtidos por *A. oryzae* IPT 301 (TE2) e *A. fumigatus* LB39J (TE4) não foram efetivos na liquefação das substâncias pécticas.

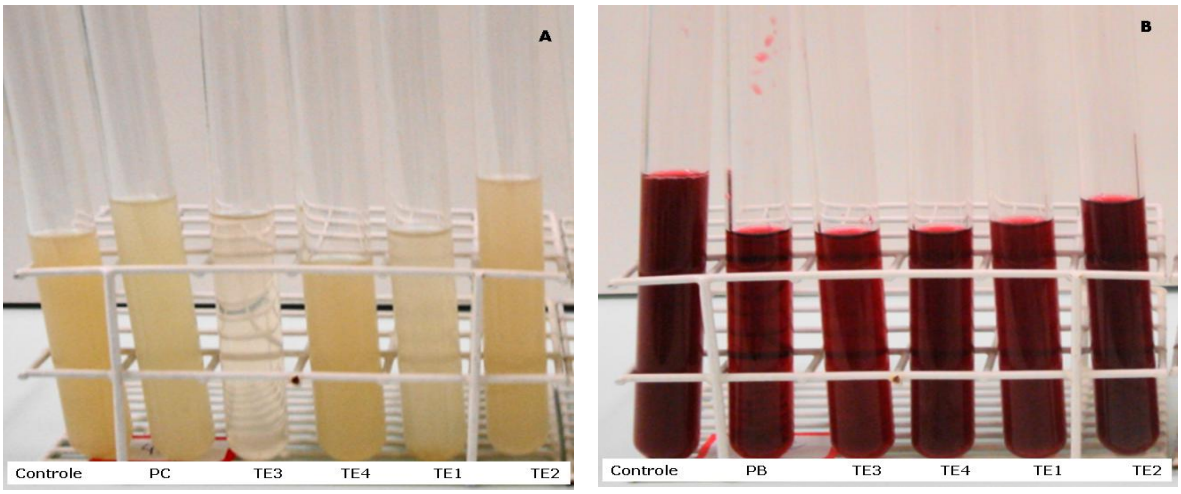


Figura 34. Efeito do tratamento enzimático no suco de maçã (A) e mirtilo (B) utilizando 1 (U) unidade de endo-PG por mL de suco durante 60 min de reação a 40°C. PC, Pectinex®Clear; PB, Pectinex®Be Colour; TE: tratamentos enzimáticos experimentais: TE1, extrato enzimático obtido por *A. niger* T000507-2; TE2, extrato enzimático obtido por *A. oryzae* IPT 301; TE3, extrato enzimático obtido por *A. niger* LB23 e TE4, extrato enzimático obtido por *A. fumigatus* LB39J.

Independentemente do tratamento (PB, TE1, TE2, TE3 e TE4), a elevação da temperatura afetou negativamente a hidrólise enzimática no suco de mirtilo. Landbo & Meyer (2004) também constataram que o incremento da temperatura de reação não ocasionou maior degradação das substâncias responsáveis pela turbidez em suco de mirtilo.

Para o extrato TE1, a temperatura ideal estimada para ação das pectinases foi 50ºC, assim como para os extratos TE3 e TE4 para os quais não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas de 40 e 50ºC e 40, 50 e 60ºC, respectivamente. Estes resultados confirmam que o sucesso da aplicação das enzimas pectinolíticas na clarificação de sucos depende, entre outros fatores, das características do substrato sobre o qual elas agem, pois as pectinas não se encontram isoladas nos sistemas e sim em associação, principalmente, com a celulose e hemicelulose (Zhongdong *et al.* 2006). Desta forma, sugere-se que, o incremento da temperatura tenha favorecido a solubilização destas macromoléculas, que não são degradáveis pelas pectinases presentes. Outra hipótese para este resultado pode ser atribuída à ação das pectinases, que podem não apresentar a mesma atividade sobre as pectinas de alto ou baixo peso molecular e/ou com diferentes ramificações, que teriam sido liberadas durante a elevação da temperatura, ou, ainda, algumas destas pectinases responsáveis pela degradação destas pectinas podem ser termosensiveis.

Os valores de pH dos sucos *in natura* determinados foram 4,02 para o suco de maçã e 2,97 para o suco de mirtilo. O pH do suco de mirtilo é desfavorável para ação de endo-PG presente nos extratos enzimáticos experimentais, principalmente, nos obtidos com *A. oryzae* IPT 301 e *A. fumigatus* LB39J e nas preparações enzimáticas comerciais. Na Tabela 15, é mostrado que os valores de pH dos sucos tratados ficaram muito próximos aos determinados para os sucos *in natura*, independentemente do tratamento enzimático e da temperatura de hidrólise.

Tabela 15. Valores de pH dos sucos de maçã e mirtilo após o tratamento enzimáticos.

	40°C	**50°C**	**40°C**	**50°C**
Suco controle	4,06	4,10	3,00	2,98
Pectinex®Be Colour	----------	----------	2,96	2,96
Pectinex®Clear	3,96	3,97	----------	----------
TE1 *(A. niger* T000507-2)	4,14	4,07	2,98	2,99
TE2 *(A. oryzae* IPT 301)	3,99	3,91	2,96	3,00
TE3 (*A. niger* LB23)	4,07	4,05	2,98	2,99
TE4 (*A. fumigatus* LB39)	4,03	4,01	2,96	3,00

*Os valores correspondem à média de duplicatas. Letras iguais não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$).

De acordo com a Tabela 16, os teores de polifenóis (mg EAG/100mL) e a atividade antioxidante (μM trolox/mL) determinados nos sucos clarificados não aumentou após o tratamento enzimático, e, em geral, apresentaram um pequeno decréscimo. Este resultado pode ser atribuído à precipitação das substâncias pécticas que arrastou consigo outros compostos, como fenóis, os quais foram removidos por centrifugação. Entretanto, pode-se afirmar que a hidrólise enzimática preservou grande parte destes compostos. Este resultado é bastante favorável, pois muitos autores verificaram que a clarificação enzimática ocasionou uma redução no teor de polifenóis e na capacidade antioxidante dos sucos (Landbo *et al*. 2006; Meyer *et al.* 2001). Por outro lado, a ação enzimática pode incrementar o teor dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante quando o tratamento enzimático ocorre na etapa da maceração dos tecidos vegetais (extração do suco), em que é esperado que a maior liquefação destes tecidos favoreça a extração de fenóis (Buchert *et al.* 2005; Bagger-Jorgensen & Meyer, 2004).

Observa-se, também, que os sucos tratados com os extratos enzimáticos experimentais apresentaram, de forma geral, maiores teores de polifenóis e maiores atividades antioxidantes, quando comparados com os sucos tratados com as preparações enzimáticas comerciais. Segundo Pinelo *et al.* (2006), a presença de atividades enzimáticas secundárias nas preparações enzimáticas pode mudar o perfil de compostos fenólicos e afetar capacidade antioxidante dos sucos.

Tabela 16. Teores de polifenóis (FT) e atividade antioxidante (AAT) dos sucos de maçã e mirtilo.

	Suco de maçã		**Suco de mirtilo**	
Tratamento	40ºC	50ºC	40ºC	50ºC
	FT (mg de EAG/100mL)			
Suco controle	14,86±0,40 ^{a}	16,07±0,80 ^{a}	154,15±3,43^{a}	160,20±0,51^{a}
Pectinex®Be Colour	----------	----------	145,65±1,04^{a}	130,97±3,06^{b}
Pectinex®Clear	13,48±0,13 ^{b}	14,09±0,77^{a}	----------	----------
TE1 *(A. niger* T000507-2)	14,26±0,67 ^{a}	14,36±0,51^{a}	148,75±5,58^{a}	157,19±3,60^{a}
TE2 *(A. oryzae* IPT 301)	13,38±0,86 ^{b}	15,41±0,20 ^{a}	155,73±5,66^{a}	151,85±11,16^{a}
TE3 (*A. niger* LB23)	15,32±0,47 ^{a}	15,42±0,68^{a}	156,40±7,81^{a}	156,58±1,37^{a}
TE4 (*A. fumigatus* LB39)	15,28±0,53 ^{a}	14,31±0,76^{a}	157,25±5,06^{a}	144,31±5,35^{a}
	AAT (μM trolox/mL) *			
Suco controle	4,87±0,04^{d}	5,28±0,12 ^{d}	28,83±0,88^{ab}	32,61±0,91^{a}
Pectinex®Be Colour	----------	----------	22,02±2,18^{c}	20,70±2,20^{c}
Pectinex®Clear	4,43±0,11^{d}	4,78±0,10^{d}	----------	----------
TE1 *(A. niger* T000507-2)	4,53±0,00^{d}	4,81±0,05^{d}	25,44±0,79^{bc}	31,71±0,52^{a}
TE2 *(A. oryzae* IPT 301)	4,35±0,23^{d}	4,37±0,01^{d}	26,89±0,20^{b}	26,20±1,39^{bc}
TE3 (*A. niger* LB23)	4,82±0,02^{d}	4,93±0,05^{d}	28,16±1,20^{ab}	31,06±0,62^{a}
TE4 (*A. fumigatus* LB39)	4,58±0,13^{d}	4,85±0,11^{d}	27,81±0,27^{ab}	25,82±0,49^{bc}

Os valores correspondem à média de triplicatas. Letras iguais não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p<0,05$). *Trolox equivale a (μM TEAC/mL) em 6 min.

Comparando-se os resultados encontrados para os teores de polifenóis e atividade antioxidante no suco de maçã com outros estudos, observa-se uma grande variação entre os valores. Thielen *et al*. (2004) determinaram valores de polifenóis entre 89 e 437 mg /L e Kahle *et al*. (2005) estimaram teores de 154-178 mg /L para os sucos de maçãs de diferentes variedades. O teor de polifenóis e capacidade antioxidante na maçã e no suco são afetados por muitos fatores, principalmente pela variedade de maçã (Davey & Keulemans 2004; Wolfe *et al.* 2003; Schmitz-Eiberger *et al.* 2003), o grau de maturação do fruto (Kondo *et al.* 2002), além do método de obtenção do suco (Schols *et al.* 1991). A correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante nem sempre é linear, pois os compostos fenólicos sofrem alterações em contato, principalmente com o oxigênio. Na maçã, a capacidade antioxidante é atribuída, principalmente, a estabilidade dos compostos fenólicos, como os flavonóides e os ácidos fenólicos (Eberhardt *et al*. 2000; Lee *et al*. 2003). De acordo com Zardo *et al*. (2009), a reação de escurecimento enzimático é a principal responsável pela perda da atividade antioxidante em sucos de maçãs, podendo reduzir até 83% da AAT.

A alta atividade antioxidante dos sucos de mirtilo pode ser atribuída à presença das antocianinas. Estudando os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera*, Abe *et al.* (2007) encontraram maior correlação entre as antocianinas totais e a capacidade antioxidante em comparação aos fenólicos totais e a capacidade antioxidante. Kalt *et al*. (2001), Stojanovic & Silva (2007) e Müller *et al.* (2010) também concluíram que as antocianinas podem dar uma contribuição maior à atividade antioxidante do que outros compostos fenólicos.

Observando-se o teor de polifenóis e a atividade antioxidante do suco de mirtilo, observou-se, também, uma grande variação de valores. Por exemplo, Kalt *et al*.(1999) analisaram o teor de polifenóis em mirtilo (Highbush e Slowbush), encontrando valores de 227 e 277mg de AG/100g em duas espécies distintas. Prior *et al*. (1998) observaram várias amostras e encontraram um valor intermediário de 261 mg de AG/100g. Essa variação dos resultados pode ser justificada pela característica da matéria-prima. Neste estudo, as amostras de mirtilo foram congeladas e, depois, descongeladas para extração do suco, o que pode ter levado a perda das antocianinas. Isso teria ocorrido porque as antocianinas são naturalmente concentradas na epiderme e subcamadas epidérmicas de pele (Stojanovic & Silva, 2007). O conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante do mirtilo também podem variar de acordo com as espécies, variedade, maturidade, solo, regiões e práticas de cultivo,

variações ambientais e pelas condições de conservação pós-colheita (Kalt *et al*. 2003, Prior *et al.* 1998).

Com os dados obtidos na clarificação, pode-se constatar que os tratamentos enzimáticos provocaram mudanças nas antocianinas e outros fenóis presentes nos sucos. Estas mudanças, como comentado anteriormente, podem ser atribuídas às perdas durante o tratamento, à oxidação destes compostos durante a manipulação e, principalmente, decorrentes da ação enzimática na etapa de clarificação. Entretanto, os resultados são promissores, pois entre os microrganismos isolados, o extrato enzimático experimental produzido por *A. niger* LB23 (TE3) não afetou significativamente os teores destes compostos, preservando a capacidade antioxidante, e mostrou-se extremamente eficiente na redução da viscosidade, da turbidez e aumento da clarificação dos sucos. Claramente, estes resultados constituem um incentivo para o desenvolvimento de estratégias de clarificação na indústria de suco de frutas aliando a qualidade sensorial (visual) e nutricional.

5. CONCLUSÕES

- Foram selecionados 20 isolados pectinolíticos, com relação halo/colônia comparáveis aos visualizados para as linhagens de *Aspergillus niger* T0005007-2 e *Aspergillus oryzae* IPT 301.
- Em processos de produção de poligalacturonase (PG) em cultivo em estado sólido e submerso, foi possível identificar dois isolados com resultados estatisticamente iguais, em termos de produção de endo-PG, a *A. niger* T0005007-2, em cultivo em estado sólido, e *A. oryzae* IPT 301, em cultivo submerso. Os microrganismos selecionados foram identificados como *A.niger* LB23 e *A. fumigatus* LB39J.
- A atividade máxima de endo-PG produzida por A. niger LB23 foi medida em pH 4,0 e nas temperaturas entre 40-50°C, enquanto para exo-PG, verificaram-se valores máximos em pH 4,0 e temperaturas entre 50 e 60°C. Máximas atividades de endo e exo-poligalacturonases foram obtidas com temperaturas entre 20, 30 e 40ºC para o extrato enzimático bruto de *A. niger* LB23.
- No cultivo em estado sólido do *A. niger* LB23, a adição de glicose ao meio de produção inibe a síntese enzimática de poligalacturonases, enquanto que a presença do indutor (pectina cítrica), até o nível de 10 g/100g favorece à produção de poligalacturonases.
- A atividade máxima de endo-PG de *A. fumigatus* LB39J foi medida em pH entre 4,0 e 5,0 nas temperaturas entre 40 e 60°C, enquanto para exo-PG verificaram-se valores máximos em pH 5,0 e 60°C. Máximas atividades de poligalacturonases foram obtidas com temperaturas entre 20 e 40ºC para o extrato enzimático bruto de *A. fumigatus* LB39J.
- No cultivo submerso de *A. fumigatus* LB39J, a adição de glicose ao meio de produção inibe a síntese enzimática de poligalacturonases, enquanto a presença do indutor (pectina cítrica), até o nível de 20 g/L, é favorável à produção de poligalacturonases. Em ensaios em frascos maiores atividades de endo-PG foram evidenciadas em meio com pH inicial de 3,0, enquanto que para exo-PG maiores atividades foram determinadas em meio com pH inicial 4,0. Em fermentador de bancada, maiores atividades enzimáticas foram medidas em meio com pH inicial 4,0, sem controle no valor mínimo e, máximo controlado em 3,5.
- De forma geral, todos os extratos enzimáticos (experimentais) analisados reduziram a turbidez e a viscosidade e aumentaram a clarificação dos sucos de maçã e mirtilo. A

hidrólise enzimática das substâncias pécticas não reduziu significativamente o teor dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidantes dos sucos analisados.

- Com o extrato enzimático produzido por *A. niger* LB23 foi observada maior redução na turbidez e na viscosidade e uma maior clarificação dos sucos de maçã e mirtilo, quando comparado à eficiência do extrato enzimático produzido por *A. fumigatus* LB39J.
- Os resultados desse trabalho indicam que *A.niger* LB23 tem potencial para ser utilizado na indústria de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah, L. A.G.; Sulaiman, N.M.; Aroua, M.K.; Noor, M. M. M.J. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, 81(1): 65-71.

Abe, L. T.; Mota, R.V. da; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(2): 394-400.

Acuña-Arguelles, M.E.; Gutierrez-Rojas, M.; Iegra-Gonzales, G.; Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic properties produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology,** 43: 08-814.

Aidoo, K. E.; Hendry, R.; Wood, B. J. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state Fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology,** 12: 6-9.

Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, Olga. (2010). Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,**11: 299-305.

Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M.J.; Serra, J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, 33: 21-28.

Andreazza, J.; Silveira, M. M. Paesi, S.(1999). Isolamento de microrganismos produtores de pectinases. In: 45º **Congresso Brasileiro de Genética**, 1999, Gramado.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - CNNPA nº 34, de 1976 **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, de 19 janeiro de 1976. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/34_76.htm>. Acesso em 10 de março de 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para usos na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de novembro de 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 22 de agosto de 2008.

Atanda, O.O.; Akpan, I.; Rati, E.R. Ozoje, M. (2005). Palm Kernel: A potential substrate for rapid detection of aflatoxigenic fungi. **Food Science and Technology International,** 11(1): 67 –74

Bagger-Jorgensen, R. & Meyer, A.S. (2004). Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. **European Food Research and Technology,** 219: 620-629.

Bailey, M. J. & Pessa, E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology,** 12: 266-271.

Barros, S. T. D.; Mendes, E.; Peres. (2004). Influence of despectinization in the ultrafiltration of West Indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L. Meer) juices. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** 24(2): 194-200.

Bastos, M. do S. R.; Gurgel, T. E. P.; Sousa Filho, M. de S. M. de; Lima, I. de F. B.; Souza, A. C.R.de, Silva, J.B. (2002). Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura,** 24 (1): 240-242.

Bhat, M. K. (2000). Cellulases related enzymes in biothecnology. **Biotechnology Advances,** 18: 355-383.

Blandino, A.; Dravillas, K.; Cantero, D.; Pandiella, S. S.; Webb, C. (2001). Utilization of whole wheat flour for the production of extra cellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, 37(5): 497-503.

Blandino, A.; Iqbalsyah, T.; Pandiella, S.S.; Cantero, D.; Webb C. (2002). Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology,** 58: 164-169.

Bravo, C. E. C.; De Carvalho, E. P.; Schwan, R. F.; Gómez, R. J. H. C.; Pilon, L. (2000). Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus.* **Ciência e Agrotecnologia**, 24: 137-152.

Bunger, J.; Westphal, G.; Monnich, A.; Hinnendahl, B.; Hallier, E.; Muller, M. (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. **Toxicology**. 202:199-21

Buchert, J.; Koponen, J.M.; Suutarinen, M.; Mustranta, A.; Lille, M.; Törrönen. R.; Kaisa Poutanen, K. (2005). Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 5: 2548–2556.

Cannel, E. & Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, 15: 2-7.

Cardoso, M.H.; Menezes, H.C.de; Jackix, M. de N. H.; Gonçalves, E.B. (1999). Efeito dos complexos enzimáticos clarificantes CLAREX e CEC1-CTAA sobre a qualidade do

suco de banana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 849-854.

Carpita, N.C. & Gibeaut D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, 3(1): 1-30.

Chang, T. S.; Siddiq, M.; Sinha, N. K , Cash, J. N. (1995). Commercial pectinases and the yield and quality of stanley plum juice. **Journal of Food Processing and Preservation,** 9: 89-101.

Chatterjee, S.; Chatterjee, S.; Chatterjee, B.P. Guha, A.P. (2004). Clarification of fruit juice with chitosan. **Process Biochemistry**, 39: 2229-2232.

Coelho, M. A. Z.; Medronho, R. A.; Leite, S. G. F.; Couri, S. (1995). Partial purification of a polygalacturonase produced by solid state cultures of *A.niger* 3T5B8. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, 26:318-322.

Comissão Européia (2002). **Colletion of information on enzymes**. Contract NOB4 - 3040/2000/278245/MAR/E2

Cordova-Lopez, J.; Gutierrez-Rojas, M.; Huerta, S.; Saucedo-Castañeda, G.; Favela-Torres, E. (1996). Biomass estimation of *Aspergillus niger* grwing on real and model supports in solid state fermentation. **Biotechnology Techniques,** 10(1): 1-6.

Couri, S. & Farias, A. (1987). Fermentação semi-sólida e seleção de fungos filamentosos produtores de enzimas pectinolíticas. In; **SHEB**, 3. Anais...Maringá: UEM,

Couri, S. & Farias, A. (1995). Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia,** 26: 314-317.

Couto, S. R. & Sanromán, A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, 76: 291-302.

Da Silva, R.; Franco, C. M. L.; Gomes, E. (1997). Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: uma revisão. **Boletim SBCTA,** 31: 249-260.

Davey, M.W. & Keulemans, J. (2004). Determining the potential to breed for enhanced antioxidant status in Malus: Mean inter- and intravarietal fruit vitamin C and glutathione contents at harvest and their evolution during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 8031-8038.

Davies, R. W. (1994). Heterologous gene expression and protein secretion in *Aspergillus.* Progress in industrial microbiology. 29:527–560. *In:* Vries, R.P. & Visser, J. (2001). **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65 (4): 496-522.

De Gregorio, A.; Mandalani, G.; Arena, N.; Nucita, F.; Tripodo, M. M.; Lo Curto, R. B.

(2002). SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, 83 (2):89-94.

Demir, N.; Acar, J.; Sarıoglu, K.; Mutlu, M. (2001). The use of commercial pectinase in fruit juice industry, part iii: optimization of enzymatic liqufaction of carrot pulp by using immobilised commercial pectinase, **Journal of Food Engineering**, 47(4): 275-280.

Dongowski, G. & Sembries, S. (2001). Effects of commercial pectolytic and cellulolytic enzyme preparations on the apple cell wall. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(9):4236-4242.

Eberhardt, M. V.; Lee, C. Y.; Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, 22(405):903-904.

Ellis, W. O.; Smith, J.P.; Simpson, B.K.; Oldham, J.H. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 30(4):403-439.

Fawole, O.B. & Odunfa, S.A. (2003). Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodegradation**, 52: 223-227.

Ferñandes-Salomão, T. M.; Amorin, A. C. R.; Chaves-Alves, V. M.; Coelho, J. L.; Silva, D.O.; Araújo, E. L. (1996). Isolation of pectinase hyper producing mutants of *Penicillium expansum.* **Revista de Microbiologia,** 27: 15-18.

Férnandez, M.; Úbeda, J. F.; Briones, A. I. (2000). Typing of non Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, 59: 29-36.

Fontana, R.C.; Salvador, S.; Silveira, M.M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 32: 371-377.

Fontana. R.C.; Polidoro. T.A.; Silveira, M.M. (2009).Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae.* **Bioresource Technology,** 100: 4493-4498.

Frisvad, J. C.; Skouboe, P.; Samson, R. A. (2005).Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. **Systematic and Applied Microbiology,** 28:442-453.

Gailing, M.F.; Guibert, A.; Combes. D. (2000). Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. **Bioprocess Engineering**, 22: 69-74.

Gainvors, A.; Nedjaoum, N.; Gognies, S.; Muzart, M.; Nedjma, M.; Belarbi, A. (2000) Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters,** 183:131-135.

Galvano, F.; Piva, A.; Ritieni, A.; Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. **Journal of Food Protection**, 64(1):120-131.

Geralda-Silva, E.; Borges, M. F.; Medina, C.; Piccoli, R. H. E Schwan, R. F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**. 5: 859–865.

Gervais, P. & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13(2-3): 85-101.

Gracheva, I. M. & Krivova, A. Y. (2000). Engineering of enzymes preparations [in Russian], Elevar, Moscow, pp 227-255. *In:* Semenova, M.V., Grishutin, A. V.; Okunev, O. N.; Sinitsyn, A. P. (2003). **Biochemistry**, 68: 559-569.

Granada, G. L.; Vendruscolo, J. L.; Treptow, R. O. (2001). Caracterização química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus spp*. L.). **Revista Brasileira de Agrociências**, 7(2): 143-147.

Gulfi, M.; Arrigoni, E; Amadò, R. (2007). *In vitro* fermentability of pectin fraction rich in hairy regions. **Carbohydrate Polymers**, 67(3): 410-416.

Gummadi, S.N. & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry,** 38: 987-996.

Hadj-Taieb, N.; Ayadi, M.; Khlif, M., Mrad, K.; Hassairi, I.; Gargouri A. (2006). Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**, 39:1072-1076.

Hankin, L. & Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, 67: 597-607.

Hoondal, G.; Tiwari, R.; Tewari, R.; Dahiya, N.; Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Microbiology and Biotechnology,** 59(4-5): 409-418.

Ishii, S. & Yokotsuka, T. (1971) Pectin trans-eliminative with other nitrogen compound is available. This probably results fruit juice clarifying activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 19: 958-961.

Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry,** 40:2931-2944.

Kahle, K.; Kraus, M.; Richling, E. (2005). Polyphenol profiles of apple juices. Molecular **Nutrition & Food Research**, 49: 797-806.

Kalt, W.; Forney, C. F.; Martin, A.; Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(11): 4638-4644.

Kalt, W.; Lawand, C.; Ryan, D. A. J.; Mcdonald, J. E.; Donner, H.; Forney, C. F. (2003). Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush bluberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 128(6):917-923.

Kalt, W.; Ryan, D. A.; Duy, J. C.; Prior, R.; Ehlenfeldt, M. K.; Kloet, V. S. P. (2001). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidants among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* Section *cyanococcus* spp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:4761–4767.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, 77:215-227.

Kaur, G.; Kumar, S.; Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic moul *Sporotrichum termophile*. **Bioresource Technology,** 94(3):239-43.

Kondo, S.; Tsuda, K.; Muto, N.; Ueda, J. (2002). Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. **Horticultural Science**, 96:177-185.

Kossen, N.W.F. (2000). The morphology of filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,** 70:1-33.

Landbo, A.-K. R.; Pinelo, M.; Vikbjerg, A. F.; Let, M. B.; Meyer, A. S. (2006). Protease-assisted clarification of black currant juice: synergy with other clarifying agents and effects on the phenol content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 6554-6563.

Landbo, A-K. & Meyer, A. S. (2007). Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 8: 135-142.

Landbo. A-K. & Meyer, A. S. (2004). Effects of different enzymatic maceration treatments

on nhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 5(4):503-513.

Lea, A. G. H. (1998). Enzymes in production of beverages and fruit juices. In: **Enzymes in Food Processing.** Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 223-249.

Lee, K, W.; Kim, Y.J.; Kim, D.; Lee, H.J.; Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 51(22):6516–6520.

Lee, W. C.; Yusof, S.; Hamid, N. S. A.; Baharin, B. S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, 73:55-63.

Linde, G. A. (2000). Produção de pectinase por fermentação semi-sólida biorreator de coluna**. Dissertação de mestrado.** Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande

Löfgren, C. & Hermansson, A.M. (2007). Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids,** 21: 480-486.

Lonsane, B.K.; Saucedo-Castaneda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-Gonzales, G.; Ghildyal, N.P.; Ramakrishma, M.; Krishnaiah, M.M.(1991). Scale-up Strategies for Solid State Fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, 26: 1- 15.

Lorentz, R. H. (2005) Seleção de isolados de *Paenibacillus* spp com atividade enzimática e antimicrobiana. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Maccabe, A. P.; Orejas, M.; Tamayo, E. N.; Villanueva, A.; Ramón D. (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Biotechnology**, 96: 43-54.

Maiorano, A. E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas aminolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.

Maiorano, A.E. (1990). Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. **Tese de Doutorado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.

Maldonado, M.C. & Strasser de Saad, A.M. (1988). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** 20(1): 34-38

Malvessi, E. & Silveira, M.M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** 47: 693-702.

Malvessi, E. (2000). Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.

Martins, E. S.; Silva, D.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2002). Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus.* **Process Biochemistry,** 37(9):949-954.

Martins, N.; Souza S. R. de; Silva R. da; Gomes E. (2004). Pectinase Production by Fungal Strains in Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** 47(5): 813-819.

McKay, A.M. (1988). A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiol Letters,** 56: 355–358.

Meyer, A. S.; Köser, C.; Adler-Nissen, J. (2001). Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and fining treatments on turbidity and haze in cherry juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 49: 3644-3650.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry,** 31: 426.

Mitchell, D.A.; Berovic, M.; Krieger, N. (2000). Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 68:61-138.

Moyer, R. A.; Hummer, K.E.; Finn, C.E.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. (2002) Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium, Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(3): 519-525.

Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A. M.; Böhma, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **LWT - Food Science and Technology**, 43: 992–999

Murthy, R. M.V.; Karanth, N.G.; Rao, K.S.M.S.R. (1993). Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. **Advances in Applied Microbiology,** 38: 99-147.

Mutlu, M.; Sarioglu, K.; Demir, N.; Ercan, M. T.; Acar, J. (1999).The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering,** 41:147-150.

Nenadis, N.; Wang, L.F.; Tsimidou, M.; Zhang, H.Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds ising the ABTS assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52:4669-4674.

Newsome, W. H. (1986). Potencial and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, 69: 919-923

Nigam, P. & Singh, D. (1994). Solid-state (substrate) fermentation systems and their applicationsin biotechnology. **Journal Basic Microbiology,** 6: 405-423,

Nogueira, A.; Santos, D. L.; Wiecheteck, V.B.F.; Guyot, S.; Wosiacki, G. (2003). Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Publicação da UEPG.** 9(3):7-14.

Oliveira, K.F.; Malavolta, L., Souza, C.S.; Vicente, E.J.; Laluce. C. (2006). Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. **Journal of Applied Microbiology,** 100: 633-640

Pandey A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, 35: 1153–1169

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal,** 13(2-3): 81-84.

Pedruzzi, I.; Agostini, F.; Dillon, A.J.P.; Silveira, M.M. (2001) Extração de óleo essencial de limão Taiti (*Citrus latifolia*) com pectinases e celulases. In: VII Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass, **VII SHEB**. Anais. Maringá, PR.

Pilnik, W.; Voragen, A. G. J. (1993). Pectic enzymes in fruit and vegetable juice Manufacture. In: **Enzymes Food Processing**. New York: Academic Press, p363-399.

Pinelo, M.; Landbo, A.-K. R.; Vikbjerg, A. F.; Meyer A.S. (2006). Effect of clarification techniques and rat intestinal extract incubation on phenolic composition and antioxidant activity of black currant juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 54: 6564-6571.

Prior, R.L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G.; Mainland, C. M.(1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46(7): 2686-2693.

Rangana, S. (1977). **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New Delhi: McGraw-Hill, p.634.

Rossetto, C. A. V.; Viegas, E. C.; Lima, T. M. (2003). Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e épocas de amostragem. **Bragantia**, 62 (3):437- 445.

Saito, M. & Machida, S. (1999). A rapid identificacion method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by ammonia vapor. **Mycoscience,** 40:205-208.

Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology,** 39: 213-294.

Sakamoto, T.; Bonnin, E.; Quemener, B.; Thibault, J. F. (2002). Purification and characterization of two polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1572: 10–18.

Schmidel, W. & Facciotti, M.C.R. (2001). Biorreatores e Processos Fermentativos. *In:* Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.(Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., 2:179-190.

Schmitz-Eiberger, M.; Weber, V.; Treutter, D.; Baab, G.; Lorenz, J. (2003). Bioactive components in fruits from different apple varieties**. Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik,** 77:167-171.

Schols, H. A.; Veld, P.H.in't; Dellen, W. Van; Voragen, A.G.J. (1991). The effect of the manufacturing method on the characteristics of apple juice**. Z Lebensm Unters Forsch**, 192:142-148.

Silva, A. P.V.; Maia, G. A.; Oliveira, G. S. F. (1999). Estudo da produção do suco clarificado de cajá (*Spondias lutea L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** 19: 33-36.

Silva, C. F.; Schwan, R. F.; Dias, E. S.; (2000) Wheals, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of Coffee Arabica in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 60(2-3): 251-260.

Silva, D.; Martins, E. S.; Silva, R.; Gómez, E. (2002). Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricutural wastes and agro-industrial by products. **Brazilian Journal of Microbiology,** 33:318-324

Silva, E.V.da; Borges, M. F., Medina, C., Piccoli, R.H. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research** 5: 859–865

Soccol, C.R. & Vandenberghe, L.P.S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal,** 13:205-218

Solis-Pereyra, S.; Favela-Torres, M.; Gutierrez-Rojas, M.; Roussos, S.; Saucedo, G.; Guanasekaran, P. e Viniegra-González, G. (1996), Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** 12: 257-260.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, 95: 267-272.

Stojanovic, J. & Silva, J.L. (2007). Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, colour and chemical properties of rabbiteye blueberries. **Food Chemistry**, 101:898-906

Takayanagi, T.; Uchibori, T.; Yokutsuka, K. (2001). Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins. **American Journal of Enology and Viticulture**, 52(1):41-44.

Tanner, H. & Brunner, H. R. (1985). Getränke Anlytik – untersuchungsmethode für dia Labor- und Betriebspraxis. Wädesnwill: Verlag Helles. In: Nogueira. *et al.* (2006). **Ciências Agrárias**, 27(1):89-98.

Taragano, V.; Sanchez, V.E; Pilosof, A.M.R. (1997). Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters,** 19 (3): 233-236.

Tari, C.; Dogan, N.; Gogus, N. (2008). Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. **Food Chemistry,** 111: 824–829

Teixeira, M.F.S.; Lima-Filho, J.L.; Durán, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus Japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology,** 31:286-290.

Thielen, C.; Will, F.; Zacharias, J.; Dietrich, H.; Jacob, H. (2004). Polyphenols in apples: Distribution of polyphenols in apple tissue and comparison of fruit and juice. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, 100: 389-398.

Ueda, S.; Fujio, Y., Lim, J. Y. (1982). Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A. 3. **Journal of Applied Biochemistry,** 4: 524-532.

Varnam, A. H. & Sutherland, J. P. (1999). **Beverages – Technology, Chemistry and Microbiology,** Maryland: Aspen Publishers, Inc., 464 p.

Vidal, S.; Doco, T.; Williams, P.; Pellerin, P.; York, W.S.; O'neil, M.A. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydrate Research**, 326: 277-294.

Vries, R.P. & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysacharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** 65(4):496-522.

Wainwright, M. (1995). **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 228 p.

Willats, W. G. T.; Knox, J. P.; Mikkelsen, J. D. (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Tecnology**, 17: 97-104.

Williams, J. H. Phillips, T., D, Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly C. M., Aggarwal D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition,** 80: 1106-1122.

Wolfe, K.; Wu, X.Z.; Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 609-614.

Zardo, D. M.; Dantas, A.P.; Vanz, R.; Wosiacki, G.; Nogueira, A. (2009). Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** 29(1): 148-154.

Zheng, Z. & Shetty, K. (2000). Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, 35(8): 825-830.

Zhongdong, L.; Guohua, W.; Yunchang, G.; Kennedy, J. F. (2006). Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. **Carbohydrate Polymers,** 64: 548-552.

7. ANEXOS

7.1 Relatório técnico de identificação do *Aspergillus niger* LB23

Serviço: Identificação de microrganismos	**Relatório:** 080137
Interessado: Fundação Universidade de Caxias do Sul	**Data de entrada:** 22/01/2009

Serviço No.	Descrição da Amostra
080137 - 1	Fungo isolado de romã em decomposição

1. Objetivos:
Identificação de microrganismos por taxonomia convencional.

2. Metodologia utilizada:
A identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados citados na literatura de referência

3. Resultados da identificação

Serviço No.	Amostra	Resultados
080137 - 1	Fungo isolado de romã em decomposição	***Aspergillus niger*** van Tieghem 1867

4. Bibliografia:
Klich, M. A., and J. I. Pitt. **A Laboratory Guide to Common Aspergillus species and their teleomorphs**. CSIRO, Australia, 1988.
Domsch *et al*. Compendium of Soil Fungi, V.I., IHW, Verlag, 1993.

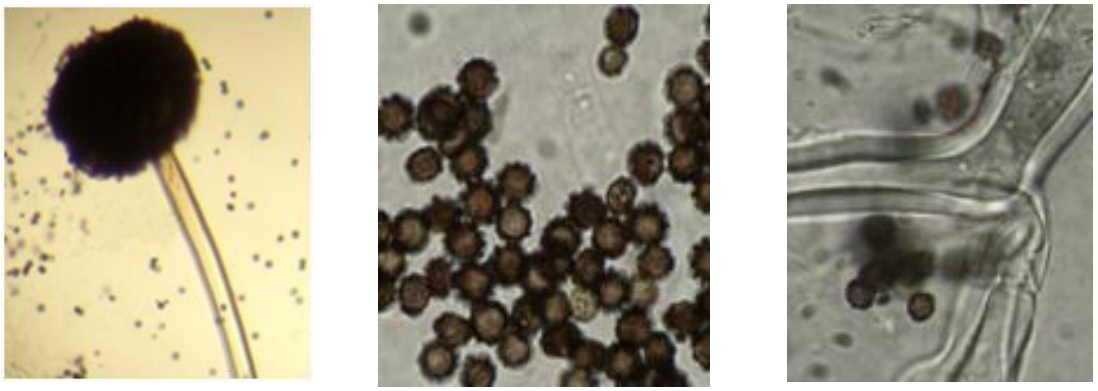
Observações:
As análises de identificação de fungo filamentoso, foram realizadas nos laboratórios da UNESP – Campus de Rio Claro, pela Dra. Derlene Attili de Angelis.
Os resultados têm significação restrita e se aplicam somente à amostra recebida para análise.

Data	Emitido por
31/Mar/2009	**Aline de Souza Lopes** Teste e Ensaios/Identificações - CCT/FAT

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO FUNGO FILAMENTOSO	Nº. SERVIÇO: 080137- 1

Resultado da identificação: *Aspergillus niger* van Tieghem 1867

a. b. c.



Legenda: Microscopia óptica: **a**. conidióforo e vesícula subglobosa; **b**. conídios verrucosos; **c**. detalhe da célula-pé evidenciando a parede grossa da hifa (x 1000).

Descrição: A cultura foi observada em MEA a 25^{o}C formando colônias tipicamente escuras, de aspecto pulverulento. Diâmetro médio das colônias: 55 x 59,5 mm. Características microscópicas em azul de lactofenol: cabeças conidiais radiadas, vesículas globosas a subglobosas de 40,5-65,5µm de diâmetro; conidióforos longos e grossos, de parede lisa, acastanhados. Células conidiogênicas bisseriadas. Métulas aproximadamente duas vezes maior que as fiálides. Conídios acastanhados, esféricos a subesféricos, verrucosos, 4,5-5,5µm de diâmetro. Presença de célula-pé.

7.2 Relatório técnico de identificação do *Aspergillus fumigatus* LB39J

Serviço: Identificação de microrganismos	**Relatório:** 090089rf
Interessado: Fundação Universidade de Caxias do Sul.	**Data de entrada:** 29/10/2009

Serviço No.	Descrição da Amostra
090089 –1	Amostra – Fungo filamentoso isolado do mamão

1. Objetivos:

Identificação de microrganismos por taxonomia convencional.

2. Metodologia utilizada:

- **Identificação de fungos por taxonomia clássica convencional.**

A identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados das espécies de referência descritas na literatura.

3. Resultados da identificação

Serviço No.	Amostra	Resultados
090089 –1	Amostra – Fungo filamentoso isolado do mamão	***Aspergillus fumigatus*** Fresenius

4. Bibliografia:

DSMZ -**Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen** disponivel em: http://www.dsmz.de/

PITT, J.I. and A.D. HOCKING (ed). 1997**. Fungi and Food Spoilage**, 2nd ed. Blackie Academic & rofessional, London.

SAMSON, R. A; *et al*. **Introduction to Food-Borne Fungi**, 4nd ed., CBS, Netherlands, 1995.

Observações:

As análises de identificações foram realizadas no laboratório do BCQ.

Os resultados têm significação restrita e se aplicam somente à amostra recebida para análise.

As culturas serão mantidas em nosso laboratório por um período de um mês a partir desta data. Após este período elas serão descartadas.

Data **02/12/2009**	Emitido por **Aline de Souza Lopes** Identificações/ Testes e Ensaios - CCT/FAT

7.3 Artigo enviado para LWT - Food Science and Technology

CLARIFICATION OF FRUIT JUICES BY FUNGAL PECTINASES

Ivana Greice Sandri, Roselei Claudete Fontana, Débora Menim Barfknecht, Mauricio Moura da Silveira

CLARIFICATION OF FRUIT JUICES BY FUNGAL PECTINASES

Ivana Greice Sandri[1], Roselei Claudete Fontana, Débora Menim Barfknecht, Mauricio Moura da Silveira

Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, PO Box 1352, Caxias do Sul, 95070-560, Caxias do Sul, Brazil

[1]Corresponding author: Ivana G. Sandri

E-mail address: igsandi@ucs.br

Phone/Fax: +55 54 32182149

ABSTRACT

This study analyses the efficiency of fungal pectinolytic preparations produced in laboratory and commercial products used in the clarification process of apple, butia palm fruit, blueberry and grape juices. Two crude enzymatic extracts, produced by *Aspergillus niger* (TE1) and *Aspergillus oryzae* (TE2), were tested in solid-state and submerse cultures, respectively, being later compared with commercial preparations (Pectinex®BE Colour-PB and Pectinex®Clear-PC). Considering pectinases total activity at 1U/mL of fruit juice, reactions were conducted at 30 and 50°C, for 30 and 60 min. Time increase resulted in an improved clarification, whereas temperature increase could not be linked to a greater clarification. Preparation TE1 was more efficient than T2 for the clarification, such result being probably related to the natural pH of juices, which favoured the action of pectinases present in the first enzymatic extract.

Key-words: pectinases, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, clarification of fruit juices

1. Introduction

Fruit juices are naturally cloudy, yet in different degrees, especially due to presence of polysaccharides (pectin, cellulose, hemicelluloses, lignin and starch), proteins, tannins and metals (Vaillant, Millan, Dornier, Decloux & Reynes, 2001). As the juice clear appearance is a determinant factor for consumers, the fruit juice industry has been investing in methods that optimize this feature (Tribess & Tadini, 2006). The high concentration of pectin leads to colloid formation, which constitutes one of the main problems during the processing of clear fruit juices. However, although the suspended pulp particles can be removed through filtration, the presence of pectin may make this method difficult (Sulaiman, Sulaiman & Liew, 1998).

The depectinisation of fruit juices through the use of pectinases has been presented as an efficient alternative to reduce turbidity, in many studies (Landbo & Meyer, 2007, Kashyap, Vohra, Chopra & Tewari, 2001, Vaillant, Millan, Brien, Dornier, Decloux & Reynes, 1999). Pectinases degrade pectin hence resulting in viscosity reduction and cluster formation, which facilitates separation through centrifugation or filtration. As a result, the juice presents higher clarity, as well as more concentrated flavour and colour (Abdullah, Sulaiman, Aroua & Noor, 2007, Kaur, Kumar & Satyanarayana, 2004, Mutlu, Sarioglu, Demir, Ercan & Acar, 1999, Blanco, Sierro & Villa, 1999).

Pectinolytic enzymes, or pectinases, act in different forms on their substrate, the pectin. The commercial pectinase preparations normally contain one or more types of microbial pectinolytic enzymes (depending on specific use), as well as cellulases, hemicellulases, proteases and amilases (Gailing, Guibert & Combes, 2000). Regarding to the microbial production of pectinases, it can be performed either through submerse or solid-state processes (Malvessi & Silveira, 2004, Fontana, Salvador & Silveira, 2005).

However, the successful use of pectinolytic enzymes in fruit juices clarification depends on the involved substrate, which may not only present different pectin concentrations, but also cellulose, hemicelluloses, lignin and other components (Vaillant *et al*. 1999). Moreover, some enzymes can be deactivated by polyphenols and other inhibitors present in some substrates (Pilnik & Voragen, 1993).

Acknowledging the fact that specific characteristics of the substrate, enzymes contained in the preparation and reaction time are involved in a successful clarification process (Ceci & Lozano, 1998), this study aimed to establish the adequate conditions for the application of pectinolytic formulations produced by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* strains, in submerse and solid-state cultures, respectively. Concentration, temperature and reaction time were observed during the experiments with apple, blueberry, butia palm fruit and

grape juices. Additionally, pH influence on total pectinolytic activity in the experimental extracts was assayed.

2. Materials and methods

2.1 Microorganisms for the production of the enzymatic extracts

A. niger T0005007-2 (University of Salta, Argentina) and *A. oryzae* IPT 301 (Institute for Technological Research of São Paulo) were used for the production of enzymatic extracts by solid-state and submerse processes, respectively. The strains were maintained by periodic cultivation in glycerin-agar medium, at 30°C for 5 days, and then stocked at 4°C.

2.2 Media for the production of enzymes

The medium used in the solid-state process was defined by Fontana *et al.* (2005), according to the following composition (per 100g): wheat bran (MOINHO NORDESTE, Brazil), 36.6 g; citric pectin (CP KELCO S.A, Brazil), 6.0 g; salt solution, 36.6 mL; *A. niger* spore suspension and distilled water, q.s.p. 100 g. The formulation of salt solution was (% m/v): $(NH_4)_2SO_4$, 4.0; $MgSO_4$, 1.0; KH_2PO_4, 2.0; $FeSO_4.H_2O$, $6.3x10^{-4}$, $ZnSO_4$, $6.3x10^{-4}$, $MnSO_4$, $1.0x10^{-5}$. After inoculation, the solid medium presented 63 % humidity.

The medium used in the submerse process was defined by Malvessi & Silveira (2004), according to the following composition (g/L): wheat bran (NORDESTE, Brazil), 40; citric pectin (CP KElco S.A, Brazil), 20; yeast extract, 0.05; $(NH_4)_2SO_4$, 5; $MgSO_4$, 0.5; KH_2PO_4, 2.5; $FeSO_4.7H_2O$, $6.3.10^{-5}$; $ZnSO_4$, $6.2x10^{-5}$; $MnSO_4$, $1x10^{-6}$. The initial pH of this medium was adjusted to 4.0 with NaOH 1N or H_2SO_4 1.5 N. The media were autoclaved at 1atm for 20 minutes.

2.3 Experimental conditions

Becker flasks (100 mL) with 12 g of medium were used to obtain the enzymatic extract in the solid-state process. The flasks were inoculated with *A. niger* spores, in order to have an initial concentration of $7x10^7$ spores / L, and incubated at 30°C in a humidity saturated environment, for 72 hours. The extraction of the obtained enzymes by solid-state process was performed through suspension of humidified solid material (2.7g) in distilled water (15 mL; pH 4), using 125 mL flasks under reciprocal agitation of 200 rpm, at 30°C. The obtained solutions were then centrifuged for 10 min at 10.000 rpm. The supernatant was kept at 4°C for using in posterior tests (Fontana *et al.* 2005).

Erlenmeyer flasks (500 mL) with 100 mL of substrate were used to obtain the enzymatic extracts by submerse process. The flasks were inoculated with a suspension of *A. oryzae* spores, aiming for an initial concentration of $1x10^6$ spores/L, and being subsequently incubated at 28°C and 200 rpm, in a reciprocal shaker (B. BRAUN BIOTECH model BIOSTAT® B, Germany). After 96 hours, the media was centrifuged for 10 min, at 10.000 rpm, the supernatant being kept at 4°C for further tests (Malvessi & Silveira, 2004).

The fruits used in this experiment were first selected and later washed in water, before being processed. Apple juice (*Malus domestica*), Gala variety, was produced through centrifugation (WALITA, Brazil). Butia palm fruit juice (*Butia eriospatha*) was obtained from fruit collected in Erechim, Brazil, later processed in a horizontal pulp-processing machine (TOMASI, Brazil). Blueberry juice (*Vaccinium myrtillus*) was produced through the liquefaction of Bluegem and Climax varieties, in equal proportions, using an industrial blender (METVISA, Brazil). Grape juice (*Vitis labrusca*), Isabel variety, was furnished by the industry MAIS FRUTA (Antônio Prado, Brazil).

Two experimental extracts obtained with *A. niger* T0005007-2 (TE1), in solid-state process, and with *A. oryzae* IPT 301 (TE2), in submerse process, were tested during the

enzymatic treatments, and later compared with two commercial preparations (NOVOZYMES LATIN AMERICA LTD, Brazil): Pectinex®BE Colour (PB) for the dark juices (blueberry and grape) and Pectinex®Clear (PC) for the light juices (apple and Butia palm fruit). Theses commercial enzymatic preparations are produced by *A. niger* and *Aspergillus aculeatus* and contain specially pectin lyase and polygalacturonase. The experimental enzymatic extracts, as well as the commercial preparations, were diluted to obtain 10 unities (U) of total pectinases (TPA) per mL. Then, to each 10 mL of juice, 1 mL of the mentioned solution was added, finally obtaining 1 U TPA / mL juice. The assays were performed in thermostatic bath (B. BRAUN BIOTECH model Certomat WR, Germany). Afterwards, the temperatures of 30 and 50°C were observed at 30 and 60 min of reaction time. Subsequently, samples were cooled in an ice bath to interrupt the reaction, and then centrifuged for 10 min, at 3.500 rpm and 20ºC. The supernatant was filtered through Whatman nr 1 paper for total removal of suspended particles. Control samples, where enzymatic preparations were substituted by distilled water, were made for all assays. The ideal pH for total pectinases was determined in both the experimental and commercial preparations. The reaction pH was assayed using different buffer solutions: sodium biphthalate (pH 3.0; 4.0; 5.0) and phosphate (pH 6.0; 7.0), specifying other standard conditions. TPA residual activity is expressed by percentage.

2.4 Analytical Methods

Total pectinase activity (TPA) was determined by measuring the reduction of viscosity of citric pectin solution (CP KELCO S.A, Brazil) 0.63% (m/v), in an acetate buffer solution 0.05 M, pH 4.0. The analysis was performed using 3.2 mL sample diluted in 14.8 mL of citric pectin, at 30°C for 30 min. Thereafter, viscosity variations were measured with a viscometer (BROOKFIELD ENGINEERING, model DV-II+, USA). One unit of total

pectinases was defined as the amount of enzyme that reduces the viscosity to 50 %, according to standard conditions (Couri & Farias 1995).

Exo-polygalacturonases (exo-PG) activity was assayed in a 50 μL diluted sample added to 2.0 mL polygalacturonic acid (SIGMA, EUA) in acetate buffer solution 0.1 M (pH 4.0) at 35°C for 30 min. Reducing substances were measured by Somogyi Method (1952). One unit of exo-PG was taken as the amount that catalyses the liberation of 1 μmol of polygalacturonic acid per minute per mL, in the reaction conditions (Couri & Farias 1995).

Pectin-methylesterase (PME) activity was determined by titration of carboxylic groups liberated through de-esterification of citric pectin (CP KELCO S.A, Brazil), according to the method described by Rouse & Atkins (1952). Citric pectin 1% (m/v) in a NaCl 0.15M, pH 4.5 solution was the substrate used in the reaction. Pectin demethylation levels were measured by the assay titration with NaOH 0.02 M, pH 4.5 at 30°C for 20 min, using an automatic pH controller (CONSORT model R735, Belgium). One unit of PME was defined as the enzyme catalytic action in the pectin demethylation correspondent to 1ηmol NaOH per min, under assay conditions.

Pectinlyase (PL) activity was estimated by measuring the increase in absorbance, due to the formation of unsaturated products, as proposed by Albershein (1966). In this method, citric pectin 1.0 mL (CP Kelco S.A, Brazil) 1% (m/v) in a citrate-phosphate buffer solution (pH 5.5) and 1.0 mL of enzymatic extract were incubated at 40°C for 1 h. The reaction was stopped by adding 3.5 mL of HCl 0.5 M. Thereafter, absorbance was read in spectrophotometer at 235 nm against one blank. Molar extinction coefficient of unsaturated products $^{e}235 = 5550\ M^{-1}\ cm^{-1}$ was used to calculate enzymatic activity, $PL = (\Delta A/^{e}235)\ 10^{9}$ (ηmol/mL/min), where ΔU represents the increase in absorbance per minute.

The cellulase complex activity was measured as “Filter Paper Activity” (FPase), according to Ghose (1987). One international unit of FPAse is defined as the amount of enzyme that

catalyzes the production of 1 μmol of reducing sugars per min, under assay conditions. The reducing sugars were quantified by using a 3.5-dinitrosalicylic acid solution, according to Miller (1959).

The enzymatic activities are expressed in units per gram of dry substrate (U/g) in the solid-state preparations (TE1), and in units per minute per mL (U/mL) in the submerse preparations (TE2).

The clarification of juices following each treatment was evaluated in spectrophotometer (AURORA INSTRUMENTS, USA) by adding absorbance results at 440 and 520 nm for light juices and 420, 520 and 620 nm for dark juices, as proposed by Rangana (1977) with modifications. The degree of clarification was expressed by percentage of clarification, calculated through obtained results in control samples of each assay.

2.5 Statistical analysis

The statistical tests were performed through variance analysis (*one-way* ANOVA) and Tuckey's test, with probability level below 5 % ($p < 0.05$).

3. **Results and discussion**

3.1 *Enzymatic activity assays of experimental and commercial preparations*

Experimental enzymatic preparations were assayed according their activity in TPA, exo-PG, PME, PL and FPase in comparison to the commercial preparations (Table 1). As expected, TPA, exo-PG, PL and FPase activities were greater in commercial preparations, since the experimental extracts have not been concentrated. A very low or even insignificant activity was noted in PME, with exception to the commercial product Pectinex®Clear. According to Varnam & Sutherland (1999), PME facilitates endopolygalacturonase activity when liberating methyl groups from the pectin chain.

Endopolygalacturonase has a key role in the polysaccharide internal chemical bonds hydrolysis and also in the total pectinolytic activity. However, according to some studies, the use of enzymatic preparations with PME in the clarification of juices promotes not only hydrolysis but also de-esterification and volatilisation of esters related to flavour, which consequently causes decharacterisation of the fruit flavour (Alana, Gabilondo, Hernando & Moragues, 1990). Moreover, PME promotes a decrease in juice stability through the precipitation of de-esterified pectin derivatives with calcium ions found in the juice, and the liberation of methanol (Alana, Gabilondo, Hernando & Moragues, 1989). However, if the clarification process is carried out only with pectinlyase (PL), the presence of methanol is not detected in the juice (Ishii & Yokotsuka, 1971). Therefore, the enzymatic preparations with *A. niger* and *A. oryzae* can potentially be used in the production of juice clarification products.

Table 1. Total pectinases activity (TPA), exo-polygalacturonase (exo-PG), pectin methylesterase (PME), pectinlyase (PL) and cellulase (FPase) in experimental enzymatic extracts and commercial preparations.

	TPA (U/mL)	**Exo-PG** (U/mL)	**PME** (U/min/mL)	**PL** (U/min/mL)	**FPase** (U/mL)
PC[e]	919[b]	179[a]	3.26[a]	828[b]	3.39[b]
PB	1150[a]	94[c]	0.01[b]	4576[a]	5.21[a]
TE1[f]	75[d]	142[b]	0.03[b]	432[c]	0.12[c]
TE2	44[c]	40[d]	0.29[b]	180[d]	0.10[c]

Different letters (a-d) indicate significant differences ($p < 0.05$) for each enzymatic activity

[e]PC, Pectinex®Clear; PB, Pectinex®Be Colour; TE1, enzymatic extract produced by *Aspergillus niger* T000507-2 and TE2, enzymatic extract produced by *Aspergillus oryzae* IPT 301.

[f]TE1 - enzymatic activity is expressed in U/g for TPA, Exo-PG and FPase, and expressed in U/min/g for PME and PL

3.2 Enzymatic treatments in fruit juices

The clarification process was tested in apple juice with the experimental preparations, having Pectinex®Clear (PC) as a reference. As it can be seen in Figure 1A, the greatest degree of clarification was obtained with the commercial compound PC and with the

experimental preparation TE1(enzymatic extract from solid-state medium), in reaction at 30°C for 30 min and at 50°C for 30 and 60 min, respectively. Results found for PC are different to those published by its own manufacturers, who define temperatures between 50 and 54ºC as the optimum for enzymatic activity. Despite being abundant in the southern Brazil, the butia palm fruit is still little used in the industry, due to its highly perishable condition (Magro et al. 2006). Therefore, further studies are necessary to establish technical parameters for the application of enzymatic complexes in butia palm fruit pulps and juices, aiming at more adequate techniques, in order to guarantee bigger stability during the storage period, which brings a viable alternative to fruit commercialisation. PC, also recommended for clarification of apple juice, was used during the experiments with butia palm fruit. The lack of published studies on enzymatic treatment of butia palm fruit juice is probably due to a very recent commercial utilisation of this fruit. Greater clarification was obtained with the experimental preparation TE1, at 30°C for 60 min, whereas inferior results were observed at 50°C. In this case, the experimental extract performance was significantly superior in comparison to the commercial product (Figure 1B).

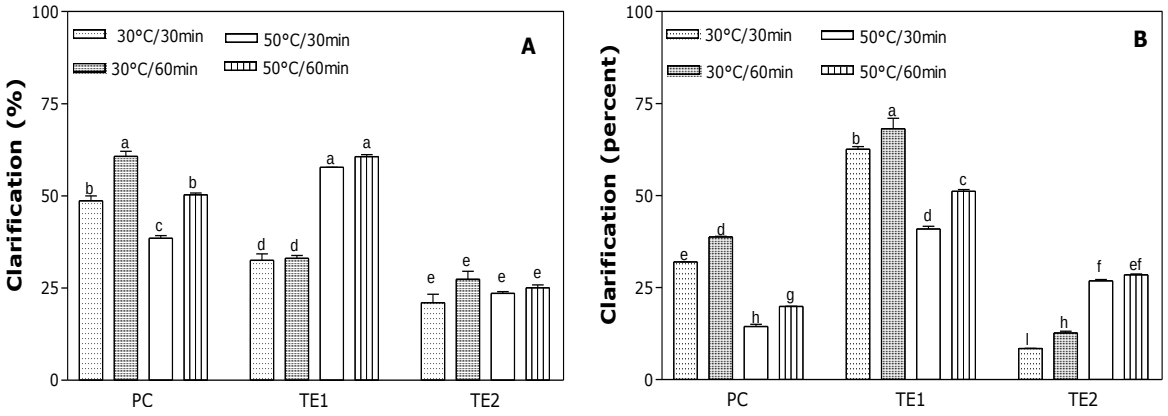


Fig. 1. Clarification of apple (A) and butia palm fruit (B) juices, using 1unit (U) of total pectinases per mL of juice, with different enzymatic treatment conditions: reaction time (30 and 60 min) and temperatures (30 and 50°C). Different letters (a-d) indicate significant differences ($p < 0.05$)

Blueberry juice presented an increase of 40 % in levels of clarification (in other words, a 40 percent decrease in turbidity) when exposed to the experimental extract T1 and the commercial product PB, with hydrolyses temperatures at 30 and 50°C for 60min (Figure 2A). Such results are superior to those obtained by Landbo & Meyer (2007), who recorded 30 % decrease in turbidity in blueberry juice, with the addiction of the commercial compound Pectinex Be. Grape juice (Figure 2B) presented optimum results with experimental extract TE1, at 50°C for 30 and 60 min.

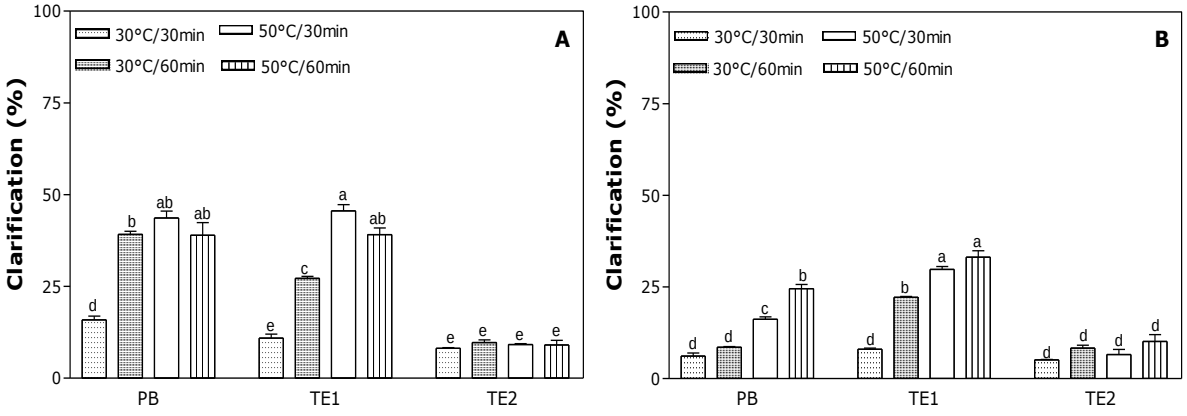


Fig. 2. Clarification of blueberry (A) and grape (B) juices, using 1unit (U) of total pectinases per mL of juice, with different enzymatic treatment conditions: reaction time (30 and 60 min) and temperatures (30 and 50°C). Different letters (a-d) indicate significant differences ($p < 0.05$)

It could be verified, through hydrolysis with experimental enzymatic extracts, that TE2, obtained with *A. oryzae* in liquid medium, was not effective in the liquefaction of particles present in all four juices, at any tested conditions. In general, fruits contain different insoluble polysaccharides, most commonly pectin, hemicellulose and cellulose, as well as structural proteins and lignin. Thus, it is possible that the obtained results have been influenced by other enzymes whose activities have not been determined by this study. In the case of apple juice, for instance, Dongowski & Sembries (2001) observed that the composition and activities of enzymes, such as pectinases, cellulases and hemicellulases, need to be considered during enzymatic treatment. However, taking that the

standardisation of different preparations has been done based on total pectinases activity (dilution at 1.0 U/mL in all treatments), it is possible that PL and FPase, found in bigger proportions in TE1, have been a differential factor to the obtained results. PL degrades esterified and non-esterified pectins, leading to a higher clarification rate (Varnam & Sutherland, 1999), besides been the only enzyme to promote pectin depolymerisation, without the previous action of other enzymes (Taragano, Sanchez & Pilosof, 1997).

The variations observed in the clarification assays with the different enzymatic preparations could be also related to the particular characteristics of each juice. Amongst these features, the significant difference between pH values of the tested juices can be noted (Table 2).

Table 2. pH values in apple Gala variety, butia palm fruit, blueberry Bluegen and Climax varieties, and grape Isabel variety natural juices.

Fruit	**pH**
Apple Gala variety	3,60[a]
Butia palm fruit	2,82 [c]
Blueberry Bluegem and Climax varieties	2,69 [d]
Grape Isabel variety	3,18 [b]

Different letters (a-d) indicate significant differences ($p < 0.05$)

The effect of pH on TPA was assessed in order to elucidate differences found in the clarification assays (Figure 3). In the laboratorial extracts TE1 and TE2, TPA superior activity occurred at pH 4.0. When the reaction was performed at pH 3.0, enzymatic activity was identical to TE1, whereas TE2 presented a decrease of 35 % in enzymatic activity. In pH values above 4.0, a continuous decrease in pectinolytic activity was observed in both experimental extracts. In the commercial preparations, TPA higher activities were observed at pH 5.0, with a decrease at bigger or smaller pH values. Considering that pH

values in the tested juices were found between 2.69 and 3.60 (Table 2), the pH test results are coherent with those found in the clarification assays, when only TE1 and TE2 are compared. However, when including in this analysis commercial preparations, it can be concluded that other factors, such as the product formulation and the presence of other enzymes apart from pectinases, are significantly important, considering the expressive results reached with PC and PB, especially in the clarification of apple and blueberry juices, respectively (Figures 1A and 2A).

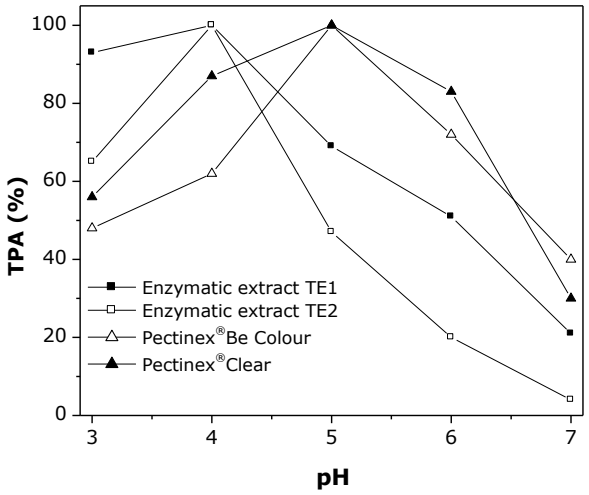


Fig. 3. pH effect on total pectinases activity (TPA) in experimental enzymatic extracts and commercial preparations, under standard conditions.

4. Conclusions

It could be observed that experimental enzymatic extracts presented excellent results in comparison to commercial preparations in the juice clarification process.

Analysing the enzymatic activity in TE1 and TE2, it could be seen TE1 higher efficiency during the juice liquefaction process. This can be partially attributed to the juices natural pH, which favoured pectinases activity in TE1. The ideal pH for pectinases in TE2 was above those determined in all juices.

When comparing the different conditions for enzymatic treatment and hydrolysis time, it can be observed, in the majority of juices, that increasing time from 30 to 60 minutes caused higher clarification, due to a greater contact between enzyme and substrate. Yet the increase in temperature did not show direct relation with the level of clarification.

Acknowledgements

The authors thank the University of Caxias do Sul (UCS) for the financial support to this study.

References

Abdullah, L. A. G., Sulaiman, N. M., Aroua, M. K., & Noor, M. M. M. J. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*. 81, 65-71.

Alana, A., Gabilondo, A., Hernando, F., & Moragues, M. D. (1989). Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environment. Microbiology*, 55, 1612-1616.

Alana, A., Gabilondo, A., Hernando, F., & Moragues, M. D. (1990). Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environment Microbiology*, 56, 3755-3759.

Albershein, P. (1966). Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology***,** 8, 628-631.

Blanco, P., Sierro, C., & Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 1-9.

Ceci, L., & J. Lozano. (1998). Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. *Food Chemistry*. 61, 237–241.

Couri, S., & Farias, A. (1995). Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiol*, 26, 314-317.

Dongowski, G., & Sembries, S. (2001). Effects of commercial pectolytic and cellulolytic enzyme preparations on the apple cell wall. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4236-4242.

Fontana, R. C., Salvador, S., & Silveira, M. M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 371-377.

Gailing, M. F., Guibert, A., & Combes. D. (2000). Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. Bioprocess Engineering, 22, 69–74.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59, 257-268.

Ishii, S., & Yokotsuka, T. (1971) Pectin trans-eliminase with fruit juice clarifying activity *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19, 958–961.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77, 215-227.

Kaur, G.; Kumar, S. & Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic moul *Sporotrichum termophile*. *Bioresource Technology*, 94, 239-43

Landbo, A-K, & Meyer, A. S. (2007). Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 135–142.

Magro, N. G. D., Coelho, S. R. M., Haida, K. S., Berté, S. D., & Moraes, S. S. (2006). Comparação físico-química de frutos congelados de Butiá eriospatha (Mart.) Becc. do Paraná e Santa Catarina. *Revista Varia Scientia*, 6, 33-42.

Malvessi, E., & Silveira, M. M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 693-702.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426.

Mutlu, M.; Sarioglu, K.; Demir, N.; Ercan, M. T., & Acar, J. (1999).The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering*, 41,147-150.

Pilnik, W., & Voragen A. G. J. (1993). Pectic Enzymes in Fruit and Vegetable Juice Manufacture. In *Enzymes Food Processing* (pp. 363-399). New York: Academic Press.

Rangana, S. (1977). *Manual of analysis of fruit and vegetable products*. New Delhi: McGraw-Hill.

Rouse, A. H. & Atkins, C. D. (1952). Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food Technology*, 6, 291-294.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 95, 267-272.

Sulaiman, M. Z., Sulaiman, N. M., & Liew, S. Y. (1998). Limiting permeate flux in the clarification of untreated starfruit juice by membrane ultrafiltration, *Chemical Engineering Journal*, 69, 145–148.

Taragano, V., Sanchez, V. E. & Pilosof, A. M. R., (1997). Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters,* 19, 233–236.

Tribess, T. B., & Tadini, C. C. (2006). Inactivation kinetics of pectinmethyesterase in orange juice as a function of pH and temperature-time process conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1328-1335.

Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M. & Reynes., M. (2001). Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration, *Journal of Food Engineering*, 48, 83–90.

Vaillant, F., Millan, P., Brien, G. O, Dornier, M., Decloux, M., & Reynes. M. (1999). Crossow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 42, 215-224.

Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (1999). *Beverages – technology, chemistry and microbiology*. Maryland: Aspen Publishers.

microbiology. Maryland: Aspen Publishers.