

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDERSON STEYNER ROZENDO

PRODUÇÃO DE PECTINASES A PARTIR DE CASCAS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ

CURITIBA - PR

2018

ANDERSON STEYNER ROZENDO

PRODUÇÃO DE PECTINASES A PARTIR DE CASCAS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Co-orientadores: Prof^o Dr. Carlos Ricardo Soccol
Prof^a. Dr^a. Cristine Rodrigues

CURITIBA - PR

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

R893p

Rozendo, Anderson Steyner

Produção de pectinases a partir de cascas de cacau (*Theobroma cacao* L.) em fermentação submersa com aplicação na clarificação de suco de maçã [recurso eletrônico] / Anderson Steyner Rozendo – Curitiba, 2018.

Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Coorientadores: Prof^º Dr. Carlos Ricardo Soccol

Prof^ª Dr^ª. Cristine Rodrigues

I. Enzimas. 2. Tecnologia química. 3. Fermentação. I. Universidade Federal do Paraná. II. Vandenberghe, Luciana Porto de Souza. III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Rodrigues, Cristine. V. Título.

CDD 660.28449

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDERSON STEYNER ROZENDO** intitulada: **PRODUÇÃO DE PECTINASES A PARTIR DE CASCAS DE CACAU (Theobroma cacao L.) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 21 de Dezembro de 2018.

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CRISTINE RODRIGUES

Avaliador Externo (UFPR)

NELSON LIBARDI JÚNIOR

Avaliador Externo (UFSC)

Dedico este trabalho a meus avós, Maria José Rodrigues Rozendo (In memoriam) e Antônio José Rosendo, que sempre estão comigo na caminhada da vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Luciana Porto de Souza Vandenberghe pela sua orientação e apoio constante para a concretização deste trabalho, de todos os ensinamentos a mim dados e pela confiança em meu trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Cristine Rodrigues e o Prof^º Dr. Carlos Ricardo Soccol pela co-orientação desde trabalho e seu apoio constante.

Aos professores e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no qual tive a oportunidade de participar para construção de minha formação profissional.

Aos Prof^º. Dr. Umberto Klock, Prof^º. Dr. Alan Sulato de Andrade e a Dr^ª Valcineide Tanobe pelo auxílio na etapa de caracterização lignocelulósica das cascas de cacau.

Aos meus familiares, por toda paciência e apoio constante a mim concedido.

À Débora Tavares, minha amiga, companheira e facilitadora de minha caminhada.

À Maria José (Dona Zezé) e Adalberto, pelo apoio e confiança.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que compartilharam desta trajetória, em especial a Natânia Martins Sabath e Joyce Gueiros por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

À Rede Integrada de Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia para o Desenvolvimento Científico, Tecnológico, de Inovação e Formação de Recursos na Cadeia Produtiva do Cacau – BIOCAU.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa.

*A ciência é muito mais do que
um corpo de conhecimentos. É uma
maneira de pensar (CARL SAGAN, 1989).*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo fazer uso de casca do cacau como potencial substrato para produção de enzimas pectinases por cepa de *Aspergillus niger* e testar a enzima produzida em processo de clarificação de suco de maçã. A caracterização da casca de cacau foi realizada para as granulometrias <0,84mm e 1,18 a 2,00 mm, obtendo-se pH 5,44 e 5,46, proteínas solúveis 7,08 e 7,36 mg/g, açúcares solúveis 50,73 e 29,56 mg/g, umidade 5,15 e 5,14%, cinzas 7,86 e 6,11%, extraíveis 17,73 e 18,11%, lignina 38,79 e 41,28%, hemicelulose 9,20 e 8,97% e celulose 18,83 e 22,29%, respectivamente. Selecionou-se a casca de cacau com granulometria < 0,84mm para a produção da enzima. A cepa utilizada nesse estudo foi selecionada dentre 11 cepas de *A. niger*. A otimização das condições físico-químicas do meio de produção compreendeu etapas com desenhos experimentais como, Plackett & Burnman, fatorial fracionado $2^{(4-1)}$, fatorial fracionado $3^{(3-1)}$ e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a determinação dos componentes de maior significância na produção da pectinase, além de ensaios para seleção da melhor fonte de nitrogênio e estudo das concentrações de extrato de pectina, extraída a partir da casca do cacau. Ao final da otimização, obteve-se atividade enzimática relativa de 602,03 (U/g) nas condições: 110,25 g/L de casca de cacau, extrato de pectina a 5% (m/v) e 0,05 g/L de extrato de levedura, incubação à 28°C e pH 4. Levando-se em consideração a atividade enzimática inicial, para o microrganismo selecionado, que era de 220 (U/g), pode-se considerar que houve um aumento de 176% na atividade enzimática nas condições avaliadas. A cinética de produção da pectinase mostrou atividade enzimática máxima em 96 horas. Para a separação e recuperação da pectinase produzida, foi feita a precipitação de proteínas com sulfato de amônio com saturação a 80%, resultando em atividade específica de 183,44 (U/mg) com rendimento em atividade de 111,56% e rendimento em proteínas de 76,08%. Em seguida, o extrato enzimático foi microfiltrado em membrana de MF 0,2 µm, e a fração permeada foi então submetida à ultrafiltração em membrana de 30 kDa, resultando em 4852,50 (U/mg) de atividade específica e rendimento de recuperação de 118,52%. A atividade enzimática após os processos de recuperação e purificação corresponde a 819 (U/g), o que corresponde a um aumento de 36%. Na caracterização da pectinase produzida, determinou-se a temperatura e pH ótimos de 60°C e 4,0, respectivamente. Ainda determinou-se K_m 3,31(mg/mL), V_{max} 22,47(µmol.mL⁻¹.min⁻¹), E_a 15,05 (KJ/mol) e E_d 47,35(KJ/mol). Em teste de estabilidade a longo prazo da enzima formulada com os aditivos benzoato de sódio e xilitol, mantida sob refrigeração (4°C), a atividade residual permaneceu em 92,41% após 60 dias. Por fim, realizou-se etapa de clarificação de suco de maçã, no qual a pectinase produzida apresentou turbidez de 448,89(NTU) em comparação a 417,89 (NTU) da enzima comercial e viscosidade de 1,86(cP) – pectinase produzida (CauPec) e 1,19(cP) – pectinase comercial, além de sólidos solúveis de 8,0 – pectinase comercial e 8,73 para a CauPec. Portanto, podendo-se concluir que a casca de cacau e o extrato de pectina da casca foram ótimos substratos para a produção de pectinases, cuja formulação é altamente estável, além de poder ser aplicada na clarificação de suco de maçã.

Palavras-chave: Casca de cacau 1. Pectinases 2. Membranas 3. Formulação 4. Clarificação de suco de maçã 5

ABSTRACT

The present study aimed at to make use of cocoa shell as a potential substrate for the production of pectinase enzymes per *Aspergillus niger* strain and to test the enzyme produced in the process clarification of apple juice. The characterization of the cocoa shell was performed for granulometry < 0.84 mm and 1.18 to 2.00 mm, obtaining pH 5.44 and 5.46, soluble proteins 7.08 and 7.36 mg/g, soluble sugars 50.73 and 29.56 mg/g, humidity 5.15 and 5.14%, ash 7.86 and 6.11%, extractable 17.73 and 18.11%, lignin 38.79 and 41.28%, hemicellulose 9.20 and 8.97% and cellulose 18.83 and 22.29%, respectively. The cocoa shell with granulometry < 0.84 mm was selected for the production of the enzyme. The strain used in this study was selected from 11 strains of *A. niger*. The optimization of the physicochemical conditions of the production medium included stages with experimental designs such as, Plackett & Burnman, fractional factorial $2^{(4-1)}$, fractional factorial $3^{(3-1)}$ and Rotational Central Composite Design (RCCD) for the determination of the components of greater significance in the production of pectinase, in addition to tests to select the best source of nitrogen and study the concentrations of pectin extract extracted from the cocoa shell. At the end of the optimization, 602.03 (U/g) was obtained for optimized conditions with 110.25 g / L of cocoa shell, 5% (m/v) pectin extract and 0.05 g/L of yeast extract, incubation at 28°C and pH 4. considering the initial enzymatic activity, for the selected microorganism, which was 220 (U/g), it can be considered that there was a 176% increase in the enzymatic activity under the conditions tested. The kinetics of pectinase production resulted in maximal enzymatic activity in 96 hours. For the separation and recovery of the pectinase produced, the protein was precipitated with 80% saturated ammonium sulfate, resulting in a specific activity of 183.44 (U/mg) with an activity yield of 111.56% and yield in proteins of 76.08%. Then, the enzyme extract was microfiltered on 0.2 µm MF membrane, and the permeate fraction was then submitted to 30 kDa membrane ultrafiltration, resulting in 4852.50 (U/mg) specific activity and recovery yield of 118.52%. The enzymatic activity after the recovery and purification processes corresponds to 819 (U/g), which corresponds to an increase of 36%. In the characterization of the pectinase produced, the optimum temperature and pH of 60°C and 4.0, respectively, were determined. K_m 3,31 (mg / mL), V_{max} 22.47 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), E_a 15.05 (KJ/mol) and E_d 47.35 (KJ/mol). In the long-term stability test of the enzyme formulated with the additives sodium benzoate and xylitol, maintained under refrigeration (4°C), residual activity remained at 92.41% after 60 days. Finally, an apple juice clarification step was performed in which the pectinase produced showed turbidity of 448.89 (NTU) compared to 417.89 (NTU) of the commercial enzyme and viscosity of 1.86 (cP) - pectinase produced (CauPec) and commercial 1,19 (cP) - pectinase, as well as soluble commercial 8.0 - pectinase solids and 8.73 for CauPec. It was concluded that the cocoa shell and the pectin extract of the peel were excellent substrates for the production of pectinases, whose formulation is highly stable, besides being able to be applied in the clarification of apple juice.

Keywords: Cocoa shell 1. Pectinases 2. Membranes 3. Formulation 4. Clarification of apple juice 5

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - VARIEDADES DE CACAU: A) CRIOLLO; B) FORASTERO E C) TRINITARIO.....	22
FIGURA 3.2 - FRUTO DE CACAU E SEUS DERIVADOS, CASCAS E AMÊNDOAS	23
FIGURA 3.3 - ESQUEMA DA PAREDE CELULAR VEGETAL, COM OS POLISSACARÍDEOS DA ESTRUTURA PRIMÁRIA: CELULOSE, HEMICELULOSE E PECTINA, ALÉM DA MEMBRANA PLASMÁTICA, LAMELA MÉDIA E PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	25
FIGURA 3.4 - ESQUEMA DA CADEIA PRINCIPAL DE POLISSACARÍDEO PÉCTICO	26
FIGURA 3.5 - ESQUEMA DA AÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES EM SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	29
FIGURA 3.6 - ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE	30
FIGURA 3.7 - ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS LIASES	30
FIGURA 3.8 - ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE	31
FIGURA 3.9 – ETAPAS DE PROCESSO INDUSTRIAL DE CLARIFICAÇÃO DE SUCO POR AÇÃO ENZIMÁTICA	38
FIGURA 4.1 - LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO TOMÉ-AÇU-PA	45
FIGURA 4.2 - CASCAS DE CACAU E SUA CLASSIFICAÇÃO GRANULOMÉTRICA	46
FIGURA 4.3 - FERMENTAÇÃO DO <i>Aspergillus niger</i> REALIZADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	53
FIGURA 4.4 - ETAPAS DE SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA ENZIMA.....	62
FIGURA 4.5 - FLUXOGRAMA DE PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ.....	70
FIGURA 5.1 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTO PLACKETT & BURNMAN	81
FIGURA 5.2 - DIAGRAMA DE PARETO REFERENTE AO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE COMPONENTES DO MEIO	

DE PRODUÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DE PECTINASES - PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(4-1)}$	83
FIGURA 5.3 - DIAGRAMA DE PARETO PARA PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO $3^{(3-1)}$ COM OS FATORES INDEPENDENTES CASCA DE CACAU, EXTRATO DE LEVEDURA E EXTRATO DE PECTINA.....	89
FIGURA 5.4 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO DCCR PARA ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS FATORES CASCA DE CACAU E CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE PECTINA.....	90
FIGURA 5.5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O PLANEJAMENTO DCCR COM OS FATORES INDEPENDENTES CONCENTRAÇÃO DE CASCA DE CACAU E CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE PECTINA.....	92
FIGURA 5.6 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PECTINASE UTILIZANDO CASCA DE CACAU EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	94
FIGURA 5.7 - PERFIL DE TEMPERATURA E PH PARA A PECTINASE PRODUZIDA POR <i>Aspergillus niger</i>	100
FIGURA 5.8 - PERFIL DO EFEITO DE ADITIVOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO INICIAL DE FORMULAÇÃO SOBRE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RELATIVA DE PECTINASE DURANTE 15 DIAS.....	106
FIGURA 5.9 - ETAPAS DO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE MAÇÃ	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS BASEADA NO ATAQUE À ESTRUTURA GALACTURÔNICA	32
TABELA 3.2 - MICRORGANISMOS E VARIADOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	34
TABELA 3.3 - EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PARA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS E SUAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO ..	39
TABELA 3.4 - EXEMPLOS DE ENZIMAS PECTINASES ENCONTRADAS COMERCIALMENTE E SEUS MICRORGANISMOS PRODUTORES	40
TABELA 4.1 - MICRORGANISMOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE PECTINASES	52
TABELA 4.2 - MEIO DE CULTIVO CONTROLE UTILIZANDO CASCAS DE CACAU	55
TABELA 4.3 - NÍVEIS CODIFICADOS E DESCODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT & BURMAN.....	56
TABELA 4.4 - FONTES DE NITROGÊNIO TESTADAS PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES	56
TABELA 4.5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(4-1)}$ – ESTUDO DO EFEITO DOS FATORES E CONCENTRAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES	57
TABELA 4.6 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO $2^{(4-1)}$	58
TABELA 4.7 - CONDIÇÕES DOS ENSAIOS COMPLEMENTARES PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES	59
TABELA 4.8 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $3^{(3-1)}$ – ESTUDO DO EFEITO DOS FATORES E CONCENTRAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES	60

TABELA 4.9 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO $3^{(3-1)}$	60
TABELA 4.10 - MATRIZ EXPERIMENTAL DO DELINEAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL PARA ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES.....	61
TABELA 4.11 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	62
TABELA 4.12 - SOLUÇÕES-TAMPÃO PARA VARIADOS pH'S	66
TABELA 4.13 - ADITIVOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DE FORMULAÇÃO DE PRODUTO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO E SUAS CONCENTRAÇÕES	68
TABELA 4.14 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2^2 PARA FORMULAÇÃO DO EXTRATO DE PECTINASES	69
TABELA 5.1 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E LIGNOCELULÓSICA DE CASCAS DE CACAU (<i>Theobroma cacao</i>).....	72
TABELA 5.2 – COMPOSIÇÃO DE CASCAS DE CACAU EM ÍONS SOLÚVEIS	74
TABELA 5.3 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR DIFERENTES CEPAS DE <i>Aspergillus niger</i> UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO	76
TABELA 5.4 - PRODUÇÃO DE PECTINASES UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO COM CASCAS DE CACAU PARA AS DIFERENTES CEPAS DE <i>Aspergillus niger</i>	77
TABELA 5.5 - SELEÇÃO DE FATORES PARA COMPOR MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES PLANEJAMENTO PLACKETT & BURMAN COM SETE FATORES, E OITO ENSAIOS TRÊS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL.....	79
TABELA 5.6 - SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES	82
TABELA 5.7 - ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE VARÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES - PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(4-1)}$	84

TABELA 5.8 - ENSAIOS COMPLEMENTARES PARA A OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES.....	87
TABELA 5.9 - ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE VARÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES - PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $3^{(3-1)}$	88
TABELA 5.10 - ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE VARÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES - PLANEJAMENTO DCCR	90
TABELA 5.11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) - PLANEJAMENTO DCCR PARA ESTUDO DO EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE CASCA DE CACAU E EXTRATO DE PECTINA SOBRE ATIVIDADE DE PECTINASE.....	92
TABELA 5.12 - PARÂMETROS PARA A PRECIPITAÇÃO DE PECTINASE COM SULFATO DE AMÔNIO	96
TABELA 5.13 - SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PECTINASES POR PROCESSO DE MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO POR MEMBRANAS	98
TABELA 5.14 - EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS SOBRE ATIVIDADE DE PECTINASE.....	101
TABELA 5.15 - PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS PARA PECTINASE PRODUZIDA POR <i>Aspergillus niger</i> A PARTIR DE CASCA DE CACAU	103
TABELA 5.16 - PARÂMETROS DE ESTABILIDADE TÉRMICA DE PECTINASE PRODUZIDA POR <i>Aspergillus niger</i>	104
TABELA 5.17 - ESTUDO DO EFEITO DE ADITIVOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO INICIAL DE FORMULAÇÃO DE PECTINASE PRODUZIDA EM CONDIÇÕES ACELERADAS	105
TABELA 5.18 - PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE O PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA POR PECTINASE EM SUCO DE MAÇÃ COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 60 MIN	108
TABELA 5.19 - PARÂMETROS ANALISADOS NO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA POR PECTINASE EM SUCO DE MAÇÃ COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 120 MIN	110

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA	- Análise de Variância
ANVISA	- Agência Nacional de Segurança Sanitária
C/N	- Carbono/Nitrogênio
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCT	- Coleção de Culturas Tropical
CENBAPAR	- Centro de Biotecnologia Agroindustrial do Paraná
DCCR	- Delineamento Composto Central Rotacional
DNS	- Dinitrosalicylic acid
EC	- Enzyme Commission
FES	- Fermentação em Estado Sólido
FESSS	- Fermentação Submersa com Sólidos em Suspensão
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MF	- Microfiltração
MWCO	- Molecular Weight Cut Off
NREL	- National Renewable Energy Laboratory
NRRL	- Northern Regional Research Laboratory
NTU	- Nephelometric Turbidity Unity
PDA	- Potato Dextrose Agar
PG	- Poligalacturonase
PL	- Pectato Liase
PMG	- Polimetilgalacturonase
PME	- Polimetil Esterase
PMGE	- Polimetilgalacturonase Esterase
TAPPI	- Technical Association of the Pulp and Paper Industry
U	- Unidade Internacional
UF	- Ultrafiltração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 JUSTIFICATIVA	19
2 OBJETIVOS	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 CACAU	21
3.1.1 Características	21
3.1.2 Subprodutos do processamento do cacau	22
3.1.3 Re-uso de cascas de cacau para a produção de produtos comerciais	24
3.2 ESTRUTURAS PÉCTICAS E PECTINASES	25
3.2.1 Estruturas pécticas	25
3.2.2 Enzimas pectinolíticas	28
3.2.3 Microrganismos produtores de pectinases	32
3.2.4 Aplicações das pectinases	36
3.2.5 Pectinases comerciais e patentes	40
3.3 PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS	41
3.3.1 Fermentação submersa com sólidos em suspensão (FESS)	41
3.3.2 Recuperação de enzimas	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE CACAU	45
4.1.1 Recebimento e acondicionamento das cascas de cacau	45
4.1.2 Caracterização físico-química das cascas de cacau	46
4.1.3 Caracterização lignocelulósica das cascas de cacau	47
4.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES	50
4.2.1 Preparo de inóculo	50
4.2.2 Manutenção e conservação do microrganismo	51
4.2.3 Meio de produção de pectinases	51
4.2.4 Seleção de cepas produtoras de pectinases em meio de cultivo sintético	51
4.2.5 Seleção de cepas produtoras de pectinases em meio contendo cascas de cacau	52

4.2.6 Procedimento de fermentação	53
4.2.7 Recuperação e separação de pectinases	53
4.2.8 Determinação da atividade pectinase	53
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	54
4.4.1 Primeira etapa de otimização - Seleção de componentes do meio para a produção de pectinases - Planejamento Plackett & Burman.....	55
4.4.2 Teste de seleção da fonte de nitrogênio.....	56
4.4.3 Terceira etapa de otimização - Planejamento experimental fatorial incompleto do tipo $2^{(4-1)}$ para determinação das concentrações dos fatores significativos.....	57
4.4.4 Testes complementares à otimização da composição do meio de produção de pectinases	58
4.4.5 Matriz do planejamento fatorial incompleto $3^{(3-1)}$ - Estudo do efeito dos fatores e concentrações sobre a produção de pectinases	59
4.4.6 Matriz experimental do planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional - Estudo do efeito dos fatores e concentrações sobre a produção de pectinases	60
4.5 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA ENZIMA PECTINASE	62
4.6 SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA ENZIMA.....	62
4.6.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônio.....	63
4.6.2 Processo de separação de pectinases por membranas.....	63
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA.....	65
4.7.1 Determinação do perfil de atividade de pectinases em diferentes temperaturas e pHs	65
4.7.2 Influência de íons sobre a atividade de pectinase.....	66
4.7.3 Determinação de parâmetros cinéticos	66
4.8 FORMULAÇÃO LÍQUIDA E ESTABILIDADE DE PECTINASES	68
4.9 APLICAÇÃO DA PECTINASE PRODUZIDA NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ	69
4.9.1 Clarificação enzimática do suco de maçã	69
4.9.2 Análises das amostras após clarificação enzimática.....	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	72
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE CACAU.....	72

5.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES.....	75
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES.....	78
5.3.1 Etapa 1 – Seleção de componentes do meio de produção de pectinases - Planejamento Plackett & Burnman.....	78
5.3.2 Etapa 2 - Seleção da fonte de nitrogênio	82
5.3.3 Etapa 3 – Estudos das concentrações de variáveis significativas para a produção de pectinases - Planejamento fatorial incompleto 2 ⁽⁴⁻¹⁾	83
5.3.4 Etapa 4 - Testes complementares para a otimização do meio de produção de pectinases	85
5.3.5 Etapa 5 - Planejamento fatorial fracionado 3 ⁽³⁻¹⁾	88
5.3.6 Etapa 6 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para estudo do efeito da concentração de casca de cacau e extrato de pectina	89
5.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PECTINASES UTILIZANDO CASCA DE CACAU COMO SUBSTRATO	94
5.5 SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PECTINASE	95
5.5.1 Precipitação de pectinase produzida a partir de casca de cacau com sulfato de amônio	95
5.5.2 Processo de separação e purificação de pectinases por membranas	97
5.6 CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASE	100
5.6.1 Determinação do perfil de temperatura e pH.....	100
5.6.2 Teste do efeito da presença de íons e outras substâncias sobre atividade de pectinase	101
5.6.3 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima pectinase	102
5.7 FORMULAÇÃO LÍQUIDA E ESTABILIDADE DE PECTINASE.....	105
5.8 CLARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO SUCO DE MAÇÃ	107
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO 1 - COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO	127

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas orgânicas que podem ser produzidas por microrganismos ou sistemas vegetais, apresentando especificidade nas reações de catálises químicas, portanto, aumentando a velocidade com a qual a reação atinja o equilíbrio. As pectinases, cujo termo é aplicado a um grupo de enzimas, composto por hidrolases, liases e esterases. São enzimas que degradam substâncias pécticas, que são os polissacarídeos estruturais presente nas células vegetais (PEDROLLI et al., 2009). A grande variedade nos grupos de enzimas pectinases está relacionada às diferentes formas de pectina, presentes na parede celular vegetal. As enzimas pectinases geralmente não dependem de cofatores e atuam em ampla faixa de pH, podendo também apresentar estabilidade térmica em altas temperaturas (GUMMADI E PANDA, 2003).

Enzimas pectinolíticas podem ser aplicadas na extração e clarificação de sucos e vinhos, extração de óleos essenciais, pré-tratamento de resíduos, água residual com teores consideráveis de pectina, na indústria de papel e celulose, além da indústria têxtil (MA et al., 2016; YU; ZHANG; GU, 2017).

Este potencial biotecnológico associado à aplicabilidade das pectinases tem um reflexo direto nas possibilidades de produção desta enzima, gerando um interesse industrial em seus processos de obtenção. Porém, os custos de produção são de considerável importância em que os produtos gerados são de alto valor agregado. Uma das alternativas a esta problemática seria a utilização de substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais.

A utilização das cascas de cacau como fonte de pectina, é subsídio importante de seu potencial uso para produção de enzimas (BARAZARTE; SANGRONIS & UNAI, 2008; CASTILHO et al., 2000; CHAN E CHOO, 2013; VRIESMANN, 2012).

As pectinases podem ter sua origem a partir de várias fontes microbianas, o que as tornam promissoras ao uso biotecnológico. Um dos gêneros de microrganismos mais utilizados na produção de enzimas microbianas é o *Aspergillus* (AHMED, et al., 2016; JAYANI et al., 2005; PEDROLLI E CARMONA, 2010).

Portanto, este trabalho objetiva a produção de enzimas pectinases em fermentação submersa utilizando como substrato cascas de cacau e como agente de fermentação uma cepa de *Aspergillus niger*. Além da produção das enzimas

pectinases o trabalho também busca testar a enzima produzida, purificada em membranas e formulada em processo de clarificação de suco de maçã.

1.1 JUSTIFICATIVA

Enzimas são moléculas orgânicas produzidas por sistemas vivos, com a função específica de catalisar reações químicas, ou seja, aumentam a velocidade com a qual a reação atinge o equilíbrio. As enzimas apresentam alta especificidade para o tipo de reação que participam, logo, comumente utilizadas em processos industriais distintos. O interesse na produção comercial de pectinases está relacionado ao potencial biotecnológico desta enzima, no entanto, o alto custo de produção muitas vezes se torna motivo de restrição ao uso. Como alternativa a este problema, alguns subprodutos agroindustriais como as cascas de cacau podem ser utilizados como substrato para a produção de enzimas, resultando na redução dos custos de produção. Portanto, a proposta deste trabalho é a produção de pectinases em fermentação submersa a partir de casca de cacau, em suspensão, utilizando uma cepa de *Aspergillus niger*, além de testar a pectinase produzida em processo de clarificação de suco de maçã.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Produzir, separar e purificar pectinases a partir de cascas de cacau e testar sua formulação na aplicação em processo de clarificação de suco de maçã.

Objetivos específicos

1. Selecionar potenciais cepas produtoras de pectinases utilizando meio de cultivo sintético;
2. Testar as cepas selecionadas em meio composto por cascas de cacau como substrato;
3. Otimizar as condições físico-químicas da produção de pectinases em fermentação submersa;
4. Recuperar e purificar a pectinase produzida;
5. Caracterizar a enzima produzida;
6. Formular e testar a estabilidade da enzima;
7. Testar a formulação enzimática obtida em processo de clarificação de suco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CACAU

3.1.1 Características

O cacau (*Theobroma cacao* L.), pertence à família Sterculiaceae e é popularmente conhecido como cacauzeiro, cacau ou árvore da vida. É uma planta originária do continente Sul Americano, em especial na região Amazônica (LORENZI, 1992; SILVA NETO et al., 2001).

O cacauzeiro é uma planta com altura mediana, podendo atingir de 5 a 8 metros de altura, com tronco medindo de 20 a 30 cm de diâmetro, possuindo folhas simples com 15 a 25 cm de comprimento. A madeira do cacau é de textura média, mole e de pouca resistência às variações climáticas adversas (LORENZI, 1992).

Os frutos do cacau são gerados no tronco e nos galhos, podendo produzir de 30 a 60 sementes. A partir da polinização, o fruto leva de 4 a 7 meses para amadurecer, este tempo irá depender da variedade do cacauzeiro, bem como das condições climáticas (LOPES E PIRES, 2014). De acordo com Silva Neto et al. (2001), os frutos quando jovens apresentam coloração verde e amarelada após o amadurecimento. Outros são de cor roxa na fase de desenvolvimento e alaranjada no período de maturação. O cacau floresce duas vezes ao ano, com maior intensidade compreendida entre os meses de dezembro a abril, também ocorrendo a maturação de seus frutos duas vezes ao ano, sendo esta de abril a setembro (LORENZI, 1992).

O cacau é classificado em dois grandes grupos, Forastero e Crioulo, e também um híbrido entre esses dois grupos, o Trinitario. O grupo Forastero é derivado da região amazônica, apresentando geralmente sementes marrom-escuras e vagens verdes. É desse grupo que provêm a maioria das variedades de cacau que são cultivadas no mundo. As árvores dessa variedade são robustas e os frutos produzidos são de sabor forte (POHLAN E PÉREZ, 2010). O grupo Criollo (Crioulo) é uma subespécie botânica de *Theobroma cacao*, tendo sua origem na América Central e no Norte da América do Sul e, as vagens são vermelhas ou verdes quando imaturas (LACHENAUD E MOTAMAYOR, 2017; LOPES E PIRES, 2014). Já o grupo Trinitario origina-se a partir do cruzamento entre Forastero e Crioulo de Trinidad, o que resulta

em variedades similares às encontradas nos grupos de origem (LOPES E PIRES, 2014). A Figura 3.1 apresenta as variedades de grupos do cacau.

FIGURA 3.1 - VARIEDADES DE CACAU: A) CRIOLLO; B) FORASTERO E C) TRINITARIO



FONTE: Adaptado de wordpress (2017).

3.1.2 Subprodutos do processamento do cacau

Os principais produtores de frutos de cacau são Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Equador, Camarões e Brasil. Juntos eles contribuem com aproximadamente 90% da produção mundial (OKIYAMA et al., 2017). As amêndoas do cacau são o principal produto comercial advindo do cacaueiro. Uma parte considerável de biomassa de cacau, cascas de cacau, é gerada durante o processamento, que logo após a quebra do cacau para retirada das amêndoas, costuma ser descartada no próprio local. As cascas de cacau correspondem a aproximadamente 52-76% em massa do fruto cacau e o seu descarte no ambiente pode provocar graves problemas ambientais, à exemplo da sua degradação por microrganismos (CHAN E CHOO, 2013; OKIYAMA et al., 2017). Levando-se em consideração a produção mundial, a geração de cascas de cacau pode ser da ordem de 700.000 toneladas anual (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2016). No tocante à produção, no Brasil o valor bruto de produção de cacau em 2017 foi de 1,60 bilhões de reais (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2017).

A casca de cacau é um valioso subproduto obtido da indústria de chocolate, rica em proteínas, fibra dietética e cinzas, além de alguns outros compostos bioativos de importância, como metilxantinas e fenólicos (BALENTIC et al., 2018). Segundo

Daut et al. (2013), as cascas de cacau apresentam em termos percentuais 74,0% de holocelulose, sendo que desta são 35,4% de celulose, 37% de hemicelulose e 14% de lignina. Abaixo é apresentado na Figura 3.2 um fruto de cacau, bem como suas partes incluindo o fruto do cacau na lateral esquerda. No canto superior direito estão as cascas cortadas em cubos e, no canto inferior direito, seção transversal do cacau expondo as amêndoas.

FIGURA 3.2 - FRUTO DE CACAU E SEUS DERIVADOS, CASCAS E AMÊNDOAS



FONTE: O autor (2018).

As cascas de cacaos, apesar de serem consideradas como um problema ambiental, em um primeiro momento, elas possuem características que as tornam potencial matéria-prima para uso no setor biotecnológico. Uma destas características é a presença considerável de pectina. Sobamiwa e Longe (1994) relatam que existem entre 5,3 e 7,1% de pectina na casca de cacau, em sua composição. Isto torna possível a aplicação das cascas para extração de pectina e mesmo a produção de enzimas pectinolíticas (CHAN E CHOO, 2013). Exemplo de uso alternativo para as cascas do cacau foi descrito por Turcotte et al. (2009), que utilizaram o subproduto como suporte em biofiltração para o tratamento de efluentes da indústria de alimentos. Segundo Barazarte; Sangronis e Unai (2008), a disponibilidade de considerável volume de cascas e sua composição em pectina poderia viabilizar a sua extração em nível industrial. Cascas de cacau também podem ser aproveitadas para uso como

adsorvente de baixo custo para retenção de poluentes como corantes industriais ou metais pesados (BERNAET e RUYSSCHER, 2013). Estudos na área da indústria de alimentos utilizaram cascas de cacau para a produção de farinha, biscoitos e agente de fortificação nutricional (BALENTIC et al., 2018; SANCHEZ MUNDO et al., 2017). Uso como corantes, biocombustíveis e na agricultura são outras alternativas (BALENTIC et al., 2018).

3.1.3 Re-uso de cascas de cacau para a produção de produtos comerciais

A acumulação de grandes quantidades de resíduos agroindustriais pode representar risco à saúde e ao meio ambiente. Alternativamente a este problema, a biotecnologia vem desenvolvendo processos de valorização de resíduos para geração de produtos com alto valor agregado, o que por consequência traz vantagens do ponto de vista ambiental e econômico (ORTIZ et al., 2017; SINGHANIA et al., 2008; SINGHANIA et al., 2009). Os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substratos para processos fermentativos, uma vez que aproximadamente 70% da matéria seca é constituída de carboidratos, onde a maior parte é celulose (PANDEY et al., 2000; TAMANINI E HAULY, 2004; VANDENBERGHE et al., 2016). Por serem constituídos principalmente por estruturas de polissacarídeos complexas, os resíduos agroindústrias podem servir como fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos, servindo para a produção de enzimas com valor comercial (AHMED, et al., 2016). Portanto, a partir das explorações na literatura a cerca das possibilidades de aplicação dos subprodutos, percebe-se a importância de uma contínua investigação e otimização de parâmetros nas pesquisas biotecnológicas com resíduos.

Os subprodutos agroindustriais vêm sendo considerados como potenciais insumos econômicos para a produção de enzimas, podendo com isto solucionar problemas da ordem ambiental e reaproveitamento de resíduos (VANDENBERGHE et al., 2016).

Diversos subprodutos agrícolas passam por algum tipo de fracionamento, para que seja possível separar partes de interesse da indústria alimentícia, o que gera um grande volume de biomassa vegetal. Estes resíduos, por sua vez, podem apresentar características em sua composição que os tornam passíveis de re-uso e/ou

reaproveitamento para geração de produtos de mais alto valor agregado (RODRIGUES et al., 2017; KARP et al., 2013; WOICIECHOWSKI et al., 2013).

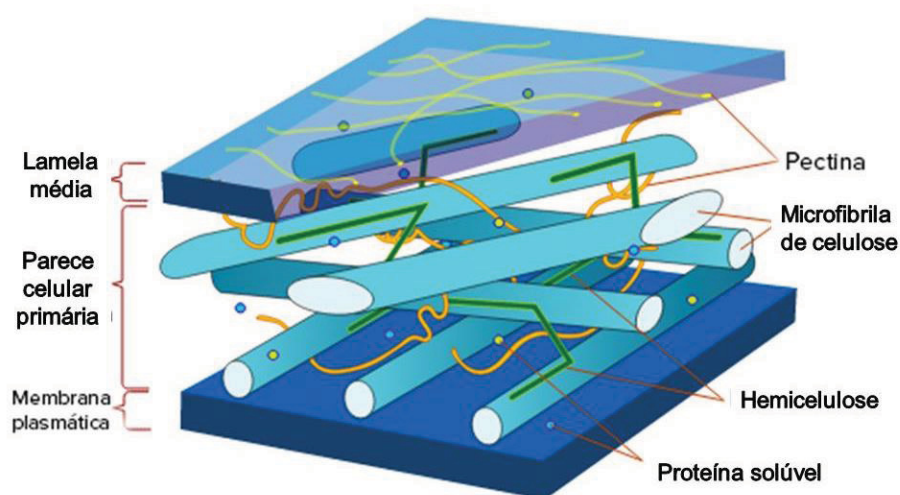
Além do uso das cascas de cacau como fonte de pectina, elas também oferecem potencial como substrato para a produção de enzimas, tais como as pectinases, que degradam substâncias pécticas, que são os polissacarídeos estruturais presente nas células vegetais (BARAZARTE;; CASTILHO et al., 2000; CHAN E CHOO, 2013; SANGRONIS E UNAI, 2008; VRIESMANN, 2012).

3.2 ESTRUTURAS PÉCTICAS E PECTINASES

3.2.1 Estruturas pécticas

As substâncias pécticas são constituintes estruturais proeminentes das células primárias presentes na parede e lamela média de tecidos vegetais não lenhosos. As enzimas que degradam as pectinas, as pectinases são importantes para as plantas, pois ajudam na extensão da parede celular e amadurecimento de frutos (JACOB, 2009). Na Figura 3.3 é possível observar no esquema, a localização das pectinas presentes na composição da parede vegetal.

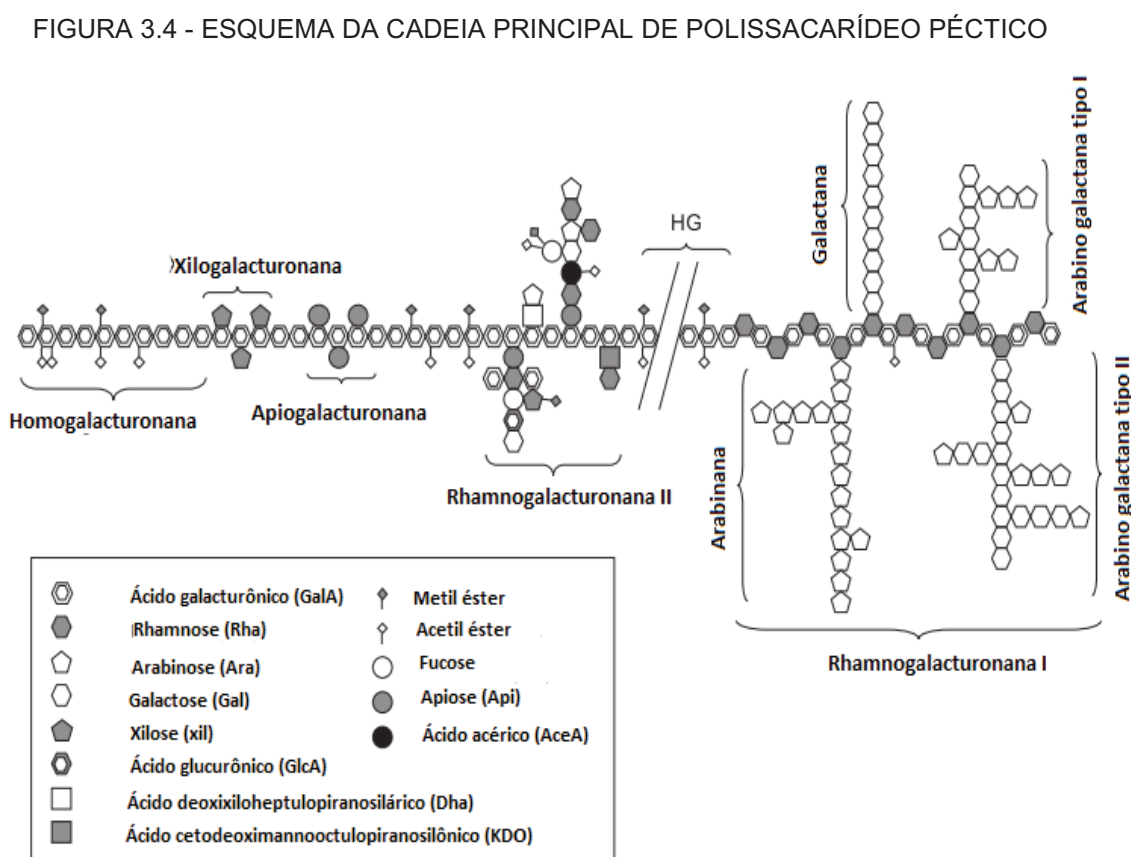
FIGURA 3.3 - ESQUEMA DA PAREDE CELULAR VEGETAL, COM OS POLISSACARÍDEOS DA ESTRUTURA PRIMÁRIA: CELULOSE, HEMICELULOSE E PECTINA, ALÉM DA MEMBRANA PLASMÁTICA, LAMELA MÉDIA E PROTEÍNAS SOLÚVEIS



FONTE: Adaptado de LA CÉLULA (2018).

A pectina é o segundo carboidrato mais abundante do tecido vegetal, ficando atrás apenas da celulose (ADAPA et al., 2014). As substâncias pécticas contribuem para processos fisiológicos complexos como crescimento celular e diferenciação celular e assim determinar a integridade e rigidez de tecido vegetal (JACOB, 2009). Além disso, as substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas que apresentam alta massa molecular e formam uma camada fina na lamela média da parede celular com material adesivo às estruturas primárias (UENOJO E PASTORE, 2007).

As substâncias pécticas são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (MOHEN, 2008; UENOJO E PASTORE, 2007) e açúcares neutros, tais como L-ramnose (Rha), L-arabinose (Ara), e D-galactose (Gal). Na Figura 3.4 é apresentado um esquema que representa uma cadeia principal da estrutura da pectina.



FONTE: Adaptado de BARRETO (2016); GULLÓN et al. (2013).

As substâncias pécticas apresentam algumas classificações com base nas modificações da cadeia principal: *pectina*, termo genérico para misturas pécticas que

contém ácido pécico em maior quantidade, ácidos poligalacturônicos, nos quais os grupos carboxílicos não estão esterificados com grupos metila; ácido pectínico, ácido poligalacturônico contendo variadas quantidades de grupos metoxílicos e protopectina, substâncias pécicas insolúveis em água e que dão origem às solúveis (MOHNEN, 2008; de OLIVEIRA, 2011; UEROJO E PASTORE, 2007). Segundo Barreto (2016), as classes estruturais dos polissacarídeos pécicos incluem homogalacturonana (HG), xilogalacturonana (XGA), apiogalacturonana (AGA), rhamnogalacturonana do tipo I (RG I) e rhamnogalacturonana do tipo II (RG II), os quais diferem na estrutura da cadeia principal, presença e diversidade de cadeias laterais.

A homogalacturonana (HG) é um polímero que compõe a região lisa das pectinas e é constituído de resíduos de ácido galacturônico (GalA) (α -D-GalA (1 \rightarrow 4)-ligados), o qual compreende 65% de pectina, sendo parcialmente metilesterificado no C-6 carboxila. A molécula é classificada de acordo com o seu nível de esterificação. Os outros polissacarídeos pécicos são consideravelmente mais complexos em estrutura do que HG (MOHNEN, 2008; PEDROLLI et al., 2009).

A xilogalacturonana (XGA) consiste de HG substituída por D-xilose na posição C-3 dos resíduos de galacturonana da cadeia principal. Este polímero pécico tem um esqueleto de α -D-galacturonano ligado a (1 \rightarrow 4), que é parcialmente substituído na posição O-3 / O-2 por resíduos β -D-Xylp não redutores (BARRETO, 2016; YAPO E GNAKRI, 2015).

No polissacarídeo apiogalacturonana (AGA), os resíduos de D-apiose estão ligados aos resíduos de GalA da HG. O conteúdo desse polissacarídeo pode variar de 0,2 a 20% na parede celular vegetal (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

Rhamnogalacturonana do tipo I (RG I) é um polímero composto por resíduos de ramnose (Rha) e ácido galacturônico (GalA) ([\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow)] ligados a cadeias laterais de açúcares neutros. Na cadeia principal da RG I ocorre repetições do dissacarídeo ramnose (Rhap) e do ácido galacturônico (GalA). Os resíduos galacturônicos podem ser acetilados e ambos os resíduos podem transportar cadeias laterais de açúcares neutros como galactose, arabinose e xilose. O RG-I é estruturalmente bastante variado, dependendo da fonte da planta, do órgão e até mesmo da localização dentro do mesmo tecido celular (PEDROLLI et al., 2009; YAPO E GNAKRI, 2015).

A Rhamnogalacturonana do tipo II (RG II), apesar de seu nome, é uma cadeia de homogalacturonana com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos

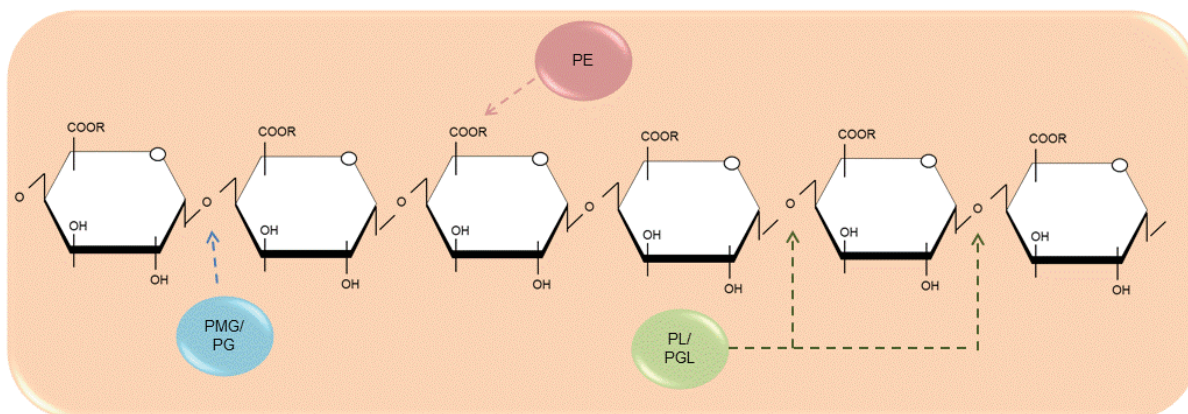
galacturônicos. Ocorre amplamente em todas as paredes primárias e podem estar ausentes na lamela média. Normalmente estão dispostas em dímeros de RG-II, ligados por um diéster borato entre os resíduos apiosil. Sua estrutura é amplamente conservada nas espécies de plantas e consiste de uma cadeia de pelo menos 8 resíduos de (1→4) ácidos α -D-galactopiranosilurônico, que ainda compreendem cadeias laterais que consistem de 12 tipos diferentes de açúcares em mais de 20 ligações diferentes (BARRETO, 2016; PEDROLLI et al., 2009; MOHNEN, 2008; YAPO E GNAKRI, 2015).

3.2.2 Enzimas pectinolíticas

O termo pectinase é aplicado a um grupo de enzimas, responsáveis pela degradação de substâncias pectinolíticas. Os mecanismos de despolimerização são efetuados pelas hidrolases e liases, enquanto que mecanismos de desesterificação são efetuados por esterases (PEDROLLI et al., 2009). A grande variedade nos grupos de enzimas pectinases está relacionada às diferentes formas de pectina, presentes na parede celular vegetal (GUMMADI E PANDA, 2003).

As enzimas pectinases são classificadas em: poligalacturonase (PG), polimetilgalacturonase (PMG), pectina liase (PL), pectato liase (PAL) e pectinametil esterase (PME) (LIU; KOKARE, 2017; PEDROLLI et al., 2009; OLIVEIRA, 2011; YUPING MA, 2016). Na Figura 3.5 é apresentado um esquema onde estão apresentados os pontos de ataque das enzimas pectinolíticas em uma molécula simplificada de pectina. A seta indica o local onde as pectinases agem sobre substâncias pécticas. PMG: polimetilgalacturonase, PG: poligalacturonase (EC 3.2.1 15). PE: pectinesterase (EC 3.1.1 11), PL: pectina liase (4.2.2 10) ou ainda PGL: exo ou endo poligalacturonase liase. As pectinases são ainda sub classificadas com base na natureza da reação.

FIGURA 3.5 - ESQUEMA DA AÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES EM SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

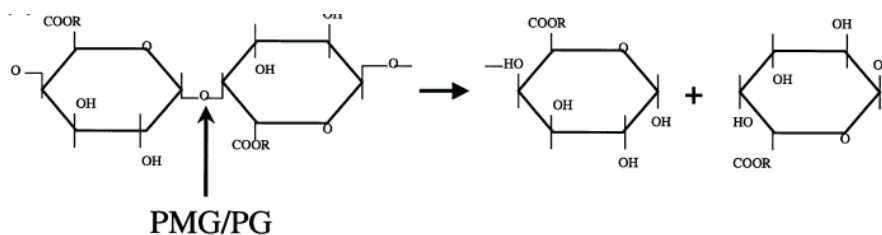


FONTE: O autor (2018). PG – Poligalacturonase; PMG – Polimetilgalacturonase; PE – Pectina esterase; PL – Pectato liase; PGL – Poligalacturonase liase

Poligalacturonase (EC 3.2.1.67, PG) - Este grupo de enzimas pectinolíticas é responsável pela clivagem hidrolítica de ligações α -1,4 glicosídicas na cadeia de ácido poligalactunônico não esterificados (PEDROLLI E CARMONA, 2010). A ação da PG pode ocorrer de modo interno à cadeia principal, o que resulta na liberação de oligômeros, bem como na extremidade não redutora, liberando monômeros. Dada a diferença de localização do sítio de clivagem na cadeia principal, as enzimas que atuam internamente são chamadas de endo- Poligalacturonases (endo-PG) e as que atuam nas extremidades, exo-Poligalacturonases (exo-PG) (PEDROLLI et al., 2009; OLIVEIRA, 2011; YUPING MA, 2016).

Polimetilgalacturonase (PMG) - As polimetilgalacturonases também pertencem ao grupo das hidrolases, logo, catalisam a clivagem de ligações α -1,4-glicosídica no esqueleto da pectina, preferencialmente pectina altamente esterificada, formando 6-metil-D-galacturonato. Este grupo ainda divide-se em: endo-polimetilgalacturonase (endo-PMG) e exo polimetilgalacturonase (exo-PMG) (PEDROLLI, 2008; PEDROLLI et al., 2009; SANTOS, 2007). Na Figura 3.6 está apresentada a catálise promovida por esse grupo das hidrolases.

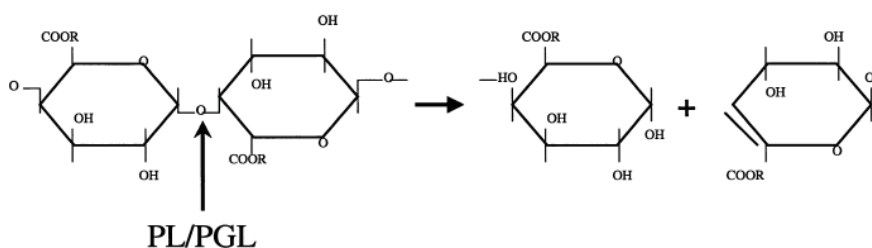
FIGURA 3.6 - ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE



FONTE: Adaptado de GUMMADI E PANDA (2003).

Liase - As liases são enzimas transeliminases, responsáveis por romper ligações glicosídicas que permitem a formação de galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 da terminação não redutora do ácido galacturônico, incluindo-se as **pectinas liases** e as **pectato liases** (GUMMADI E PANDA, 2003). Abaixo, na Figura 3.7 temos um esquema resumido da atuação das liases.

FIGURA 3.7 - ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS LIASES



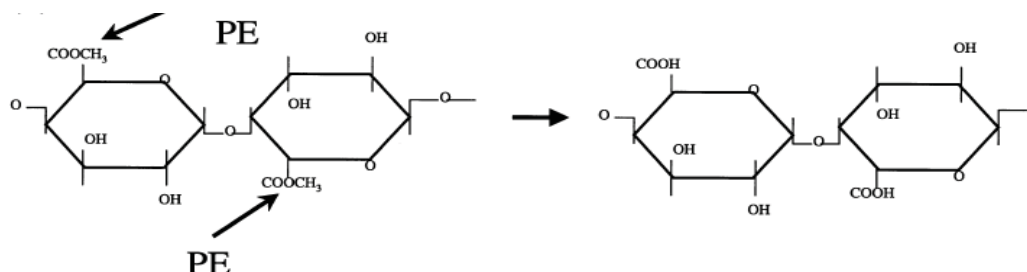
FONTE: Adaptado de GUMMADI & PANDA (2003).

A pectina liase (EC 4.2.2.10) ou polimetilgalacturonato liase (PML) realiza a quebra de ligações glicosídicas por transeliminação do hidrogênio dos carbonos 4 e 5 da porção aglicona da pectina. Enquanto a pectato liase (PL) ou poligalacturonato realiza a quebra de ligações α -1,4 de ácido pécico, mas para tanto requerem a presença de Ca^{+2} . Pectato liases são classificadas como endo-PGL (EC 4.2.2.2) que atuam no substrato de maneira aleatória, e exo-PGL (EC 4.2.2.9) que catalisa a clivagem do substrato da extremidade não redutora (PEDROLLI et al., 2009; OLIVEIRA, 2011; YUPING MA, 2016).

As *pectinametilesterases* (PME) – este grupo de enzimas atua especificamente sobre a molécula de pectina, desesterificando a pectina por hidrólise, resultando na remoção de grupos metoxílicos e de ácido pectínico. Esta reação tem como resultado a formação do ácido pécico. Uma vez que a reação ocorre por hidrólise acontece a adição de um hidrogênio e um grupo hidroxila, resultando em metanol (de OLIVEIRA, 2011). A reação da pectinametilesterase pode ser

rapidamente exemplificada pela Figura 3.8 que ilustra o ataque da enzima seguido da hidrólise das ligações de polimetilgalacturonatos.

FIGURA 3.8 - ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE



. Fonte: Adaptado de GUMMADI E PANDA (2003).

A pectina desmetoxilada é chamada de ácido péctico ou ácido poligalacturônico, sendo resultado da hidrólise da pectina, preferencialmente pectina altamente esterificada (PEDROLLI et al., 2009). Como o resultado da ação desta enzima é uma pectina com baixo grau de metoxilação, a pectinametilesterase torna-se importante no que diz respeito à atuação de enzimas que agem sobre pectina de baixo grau de metoxilação (SANTI, 2005).

Em função dos variados tipos de enzimas pectinolíticas, torna-se necessário classificá-las. Na Tabela 3.1 é apresentada a classificação das enzimas pectinolíticas com base ao ataque a estrutura galacturônica segundo as definições da *Enzyme Commission* (EC).

TABELA 3.1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS BASEADA NO ATAQUE À ESTRUTURA GALACTURÔNICA

Tipo de pectinase	Nome sugerido EC*	Sigla	Nome comum	Número EC*
Dessesterificante	polimetilgalacturonase esterase	PMGE	Pectina esterase	3.1.1.11
Hidrolase	endo-poligalacturonase	endo-PG	poligalacturonase	3.2.1.15
	exo-poligalacturonase1	exo-PG1	poligalacturonase	3.2.1.67
	exo-poligalacturonase2	exo-PG2	poligalacturonase	3.2.1.82
	endo-polimetilgalacturonase	endo-PMG	pectina hidrolase	
	exo polimetilgalacturonase	exo-PMG	pectina hidrolase	
Liase	endo poligalacturonase liase	endo-PGL	pectato liase	4.2.2.2
	exo poligalacturonase liase	exo-PGL	pectato liase	4.2.2.9
	endo polimetilgalacturonato liase	endo-PMGL	Pectina liase	4.2.2.10
	exo polimetilgalacturonato liase	exo-PMGL	Pectina liase	

Descrição sintética da classificação das enzimas pectinolíticas, baseado no ataque à estrutura galacturônica. A classificação e nomeação seguem conforme Enzyme Commission (EC). FONTE: Adaptado de UEROJO E PASTORE (2007).

3.2.3 Microrganismos produtores de pectinases

As pectinases são uma das enzimas mais disseminadas em bactérias, fungos e planta. Portanto, podem ter sua origem a partir de várias fontes de isolados, o que as tornam promissoras ao uso biotecnológico (AHMED, et al., 2016; JAYANI et al., 2005; PEDROLI E CARMONA, 2010).

Enzimas de origem microbiana são preferíveis para aplicações industriais uma vez que elas apresentam maiores produtividades, podem apresentar boa eficiência em processos desenvolvidos em maiores escalas, na recuperação e purificação, além de apresentarem maior especificidade e estabilidade (REINEHR et al., 2014).

Pesquisas na área biotecnológica voltadas ao isolamento de microrganismos produtores e/ou uso de cepas produtoras de pectinases podem ser de total relevância no setor industrial, uma vez que enzimas de origem microbiana são frequentemente relatadas na literatura.

Um dos gêneros de microrganismos mais utilizados na produção de enzimas microbianas é o *Aspergillus*, o qual compreende cerca de mais de 260 espécies e são anamorfos de ascomicetos, além de caracterizados pela produção de esporos assexuais. No referente à morfologia desse gênero, existe uma gama de variação na coloração das colônias, o que contribui na caracterização macroscópica. As colônias

têm crescimento rápido, sendo compostas por micélio aéreo com conidióforos eretos, com intensa distribuição sobre a superfície (AMORIM, 2011). Segundo Monteiro (2012), as colorações de culturas desses microrganismos podem assumir os tons azuis, verde, pretos e cinzas. Fungos do gênero *Aspergillus* são comumente encontrados em regiões de clima tropical, onde existe matéria orgânica a ser decomposta, ou seja, são sapróbios (MAIA, 2014).

A produção de enzimas pectinolíticas por *A. niger* é altamente regulada, o que permite uma captação flexível e eficiente de nutrientes. Estes microrganismos apresentam enzimas que permitem a degradação da biomassa vegetal. Isto tem como vantagem a possibilidade da utilização de biomassas antes descartadas, mas com potencial para produção de produtos de valor agregado, (KOWALCZYK et al., 2017).

Há vários exemplos do uso da espécie *Aspergillus niger* em estudos de produção de pectinases (NINGA et al., 2018; REBELLO et al., 2017; REGINATTO et al., 2017; RUIZ et al., 2012; SANDRI E SILVEIRA, 2018; SURESH E VIRUTHAGIRI, 2010; WOLF-MÁRQUEZ et al., 2017). *Aspergillus aculeatus* também foi citado como produtor de pectinases por Rajdeo et al. (2016).

Outros gêneros e espécies produtores de pectinases foram reportados. *Chrysosporthe cubensis* é um fungo filamentoso pertencente à família Cryphonectriaceae, que foi estudado por Barreto (2016) para a produção poligalacturonase. Estudos realizados por Ahlawat et al., (2007), utilizaram *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* isolados do solo para produção de pectinases. Outros autores produziram pectinases a partir de linhagens de *Bacillus subtilis* (TAKCI et al., 2016; YU; ZHANG E GU, 2017). *Penicillium janthinellum* SW09 foi identificado como produtor de quantidades significativas de pectinase extracelular, a exopoligalacturonase (exo-PG) (MA et al., 2016). O uso de *Rhizopus oryzae* também é relatado para produção de pectinases (ZHENG et al., 2017).

Abaixo, segue a Tabela 3.2 onde são apresentados alguns exemplos de uso de microrganismos para produção de enzimas pectinases, bem como algumas condições de cultivo com seus respectivos substratos e atividades enzimáticas obtidas.

TABELA 3.2 - MICRORGANISMOS E VARIADOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Microorganismo	Substrato	Meio de cultivo	Condições de cultivo*	Atividade de	Referência
<i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF	Farelo de trigo	com a seguinte composição (g/L): Farelo de trigo (36,6), pectina cítrica (6,0), solução salina (36,6), (NH ₄) ₂ SO ₄ (4,0), MgSO ₄ (1,0), KH ₂ PO ₄ (2,0), FeSO ₄ .H ₂ O (6.3x10 ⁻⁴), ZnSO ₄ (6.3x10 ⁻⁴), MnSO ₄ (1.0x10 ⁻⁵).	Temp.: 30 °C pH: 4,0	68 U/g	SANDRI & SILVEIRA, 2018
<i>Aspergillus niger</i> CCT 0916	Pedúnculo de caju	Pectina cítrica (10 g/L, NaNO ₃ (3 g/l), KH ₂ PO ₄ (1 g/L, MgSO ₄ (0,5 g/L), KCL (0,5 g/L), FeSO ₄ 7H ₂ O (0,01 g/L, Agar-Agar (20,0 g/L), Água (q.s.p.)	Umidade: 40% Temp.: 30 °C pH: -	16 U/g	SANTOS, 2007
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de laranja	(NH ₄) ₂ SO ₄ e Extrato de levedura (1:1)	pH: 5	-----	MAHMOODI; NAJAFPOUR E MOHAMMADI, 2017
<i>Aspergillus niger</i> MTCC-281	Farinha de trigo	KHPO ₄ 3H ₂ O (1 g/L), Extrato de levedura (5 g/L), Glicose (30 g/L), Czapek concentrado (10 ml), Czapek concentrado contendo (g/100 mL), NaNO ₃ (30g/L), KCl (5 g/L), MgSO ₄ 7H ₂ O (5 g/L), FeSO ₄ 7H ₂ O (0.1 g/L)	30 °C pH: 5,5	6,1 U/mL	PALANIYAPPAN et al, 2009
<i>Aspergillus niger</i> MIUG 16	Farelo de trigo, farelo de beterraba	-----	Temp.: 40 °C pH: 4,6	-----	DINU et al, 2007
<i>Aspergillus flavus</i>	Farelo de arroz	Farelo de arroz (5 g), (NH ₄) ₂ SO ₄ (6,0 g), K ₂ HPO ₄ (6,0 g), KH ₂ PO ₄ (6,0 g), MgSO ₄ 7H ₂ O (0,1 g)	Temp.: 35 °C pH: 5,5	15,55 U/mL	THANGARATHAM E MANIMEGALAI, 2014

<i>Bacillus</i> sp. BP-7	-----	-----	Temp.: 65 °C pH: 10	23 U/mL	SORIANO et al, 2005
<i>Bacillus</i> sp. MFW7	Resíduos de mandioca	Resíduos de mandioca (0,3 g/L), Sacarose (10,0 g/L), KNO ₃ (0,6 g/L), KH ₂ PO ₄ -1, MgSO ₄ (0,25 g/L), CaCl ₂ (0,1 g/L), NaNO ₃ (2 g/L), K ₂ HPO ₃ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L) e extrato de levedura (1 g/L)	35 °C pH: 6,5	-----	MUKESH et al, 2012
<i>Paenibacillus</i> sp. BP-23	-----	-----	55 °C pH: 10	47 U/mL	SORIANO et al, 2005
<i>Fusarium</i> sp.	-----	Pectina (10 mg), sacarose (10 mg), triptona (3 mg), extrato de levedura (2 mg), KCl (0,5 mg), MnSO ₄ (0,01 mg), MgSO ₄ (0,05 mg), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2 mg)	Temp.: 27 °C pH: 6,0	40 U/ml	RAJENDRAN et al, 2011
<i>Fusarium moniliforme</i> (NCIM 1276)	Casca de manga	Casca de manga (6,5%), peptona (1%), (NH ₄) ₂ NO ₃ (0,60%), MgSO ₄ (0,05%), ZnSO ₄ (0,06%) e KH ₂ PO ₄ (0,4%)	Temp.: 30 °C pH: -	43,2 U/g	KUMAR et al, 2010
<i>Rhizopus</i> sp. C4	Casca de laranja	NH ₄ NO ₃ (0.43%), Na ₂ SO ₄ (0.021%), MgSO ₄ 7H ₂ O (0.077%), ZnSO ₄ 7H ₂ O (0.042%), KCl (0.162%), Ca (OH) ₂ (0.011%).	Temp.: 30 °C pH: -	11,63 U/mL	HANDA et al, 2016

3.2.4 Aplicações das pectinases

Enzimas pectinolíticas podem ser aplicadas na extração e clarificação de sucos e vinhos, extração de óleos essenciais, pré-tratamento de resíduos, água residual com teores consideráveis de pectina, na indústria de papel e celulose, além da indústria têxtil (MA et al., 2016; YU; ZHANG; GU, 2017).

As enzimas pectinolíticas são empregadas na indústria têxtil para remoção de pectina das fibras de celulose, facilitando assim o processamento. Geralmente são utilizadas pectinases alcalinas para maceração das fibras vegetais e pectina liase no processo de degomagem de fibras de rami. Seu uso é vantajoso, porque pode substituir produtos químicos nocivos para o meio ambiente (HABRYLO et al., 2018; KASHYAP et al., 2001; UENOJO E PASTORE, 2007).

As pectinases podem ser utilizadas para extração de óleos vegetais e/ou essenciais, onde nestes processos, as enzimas auxiliam na diminuição das propriedades emulsionantes da pectina (BARRETO, 2016). Diversos óleos como girassol, coco, canola e oliva podem ser extraídos por enzimas pectinolíticas, ou mesmo preparações enzimáticas contendo pectinases, hemicelulases e celulases (REBELLO et al., 2017; UEROJO E PASTORE, 2007; YU; ZHANG E GU, 2017). Apesar das vantagens de pectinases na extração de óleos, a aplicação de dessas enzimas no processo industrial de azeite é limitada pelo seu custo de produção, daí a necessidade de seleção de cepas com maior capacidade de produção (Ortiz et al., 2017). Por fim, uma das principais vantagens do uso das pectinases para extração os óleos é que tradicionalmente as extrações são feitas por solventes orgânicos, que apresentam potencial carcinogênico e, com a extração enzimática este problema tende a ser resolvido (PEDROLLI et al., 2009).

Na indústria de papel e celulose a utilização de enzimas microbianas tem sido promissora no intuito de diminuir o uso de produtos nocivos tais como o cloro e o dióxido de cloro, além de outros que podem ser mutagênicos e bioacumulativos. Enzimas pectinolíticas são utilizadas no biobranqueamento no processo de fabricação de papel (AHLAWAT et al., 2007). A pectina exerce função de barreira protetora nas fibras da parede celular e, a partir da remoção seletiva de pectina pela ação de pectinases, pode ocorrer a acessibilidade de produtos que facilitem o processo de polpação (LIU et al., 2017).

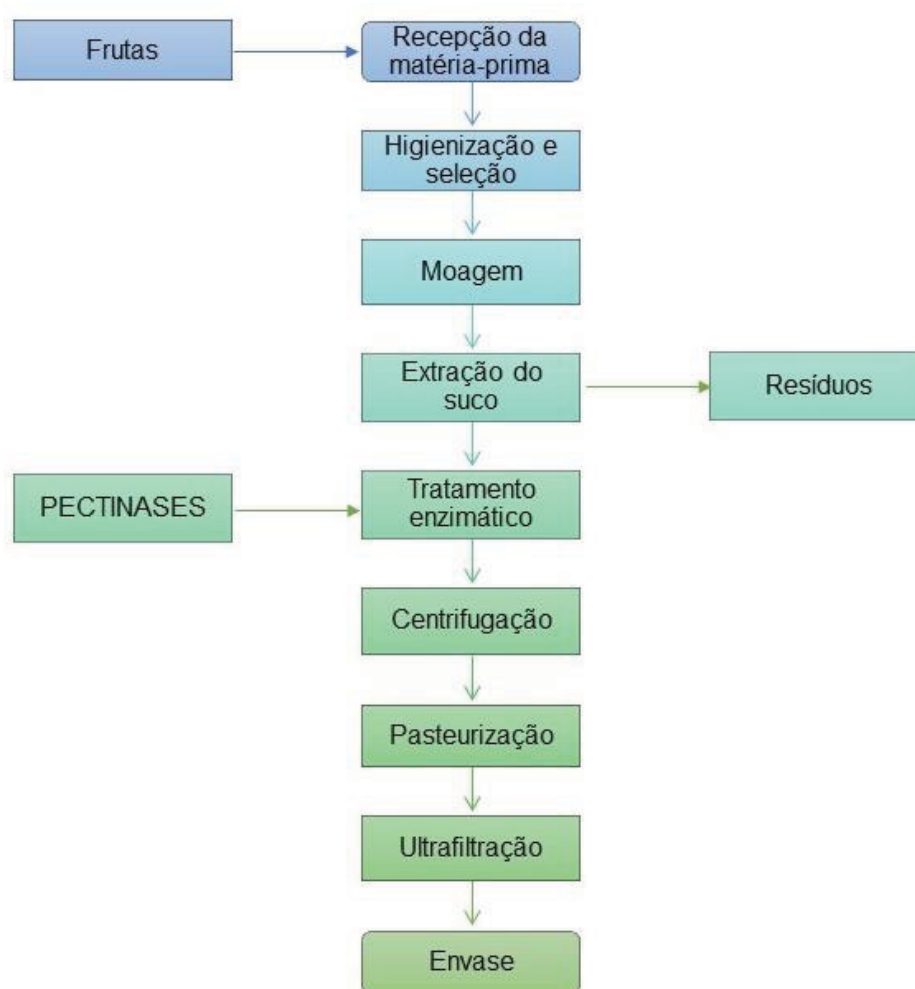
Águas residuais de indústrias cujo material processado contenha quantidades consideráveis de pectina podem ser tratadas pelo método enzimático, com uso de pectinases. No tratamento de águas residuais provindas do processamento de citros, alguns processos como lodo ativado e coagulação química já foram testados, entretanto, o custo com o tratamento e a baixa eficiência devido à resistência química das substâncias pécnicas, torna evidente a necessidade de se fazer o aperfeiçoamento de técnicas para os tratamentos à base de pectinases (KASHYAP et al., 2001). Normalmente essas águas são resultado do processamento de frutas como laranja, limão, manga e maçã. Essas matérias-primas apresentam em sua composição celulose, 9% a 25%; micro fibrilas e hemiceluloses, 20%-50%; substâncias pécnicas, 10%-35% e proteínas, 10%. Desse modo, enzimas pectinolíticas poligalacturonases, pectato liase e pectina liase podem auxiliar na degradação desses resíduos (MAHESH et al, 2016). Segundo Reginatto et al (2009), o tratamento biológico aeróbico de águas residuárias contendo pectina mostrou um leve aumento do nível de toxicidade em água tratada devido ao aumento gradual de compostos poliaromáticos no tratamento da pectina. Em estudos realizados, uma cepa fúngica de *Aspergillus ibericus* foi isolada de resíduos alimentares para a produção de pectinase que foi imobilizada e utilizada para tratar água de resíduo cítrico (MAHESH et al, 2016).

Dentre as principais aplicações das pectinases estão seu amplo uso na indústria de bebidas, devido à sua capacidade de melhorar a prensagem de frutas e clarificação de sucos. As poupas de sucos são compostas por matéria rica em pectina, quando este material é triturado a pectina que antes se encontrava insolúvel passa para o meio aquoso, aumentando sua disponibilidade e, conseqüentemente, a viscosidade do meio. Nesse sentido a aplicação de pectinases promove a degradação das pectinas, resultando na redução da viscosidade, que tem como grande vantagem a facilitação do processamento físico do suco, tais como prensagem e filtração (NADAROĞLU et al., 2010). A degradação da parede celular da biomassa de polpas, quando realizada por ação enzimática terá sua eficiência dependente do tipo de enzimas e/ou consórcios de enzimas envolvidas, pH, concentração de enzimas, tempo de incubação da enzima e velocidade de agitação, podendo o rendimento do suco chegar à 96,8% com uso pectinases (SHARMA; PATEL; SUGANDHA, 2016).

Na produção de vinho, as pectinases são usadas para melhorar os rendimentos do suco e melhoria da cor, aumentando a sua clareza (VENKATESH E

UMESH-KUMAR, 2005). Os métodos tradicionais de clarificação compreendem filtração e centrifugação, que procuram obter sucos clarificados, entretanto com deficiência na estabilidade. Agentes como bentonita, gelatina e sílica podem produzir um suco clarificado e estabilizado, no entanto isto pode causar a perda de compostos fenólicos e atividade antioxidante (CERRETI et al., 2017; ERKAN-KOÇ et al., 2015). Na Figura 3.9 vemos as etapas típicas de um processo de clarificação de sucos com uso de enzimas.

FIGURA 3.9 – ETAPAS DE PROCESSO INDUSTRIAL DE CLARIFICAÇÃO DE SUCO POR AÇÃO ENZIMÁTICA



FONTE: O autor (2018).

Os processos de extração de sucos, como o de maçãs incluem lavagem, triagem e trituração de maçãs em um moinho e, muito frequentemente as pectinases são adicionadas nesta etapa (KASHYAP et al., 2001). Durante o processo, a

viscosidade do sumo é reduzida e a opacidade do sumo turvo é alterada para uma aparência mais clarificada (SHARMA et al., 2014; KASHYAP et al., 2001). Na Tabela 3.3 é encontram-se exemplos de aplicações de pectinases na clarificação de sucos.

TABELA 3.3 - EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PARA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS E SUAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO

Fruta/vegetal	incubação (min)	Temperatura (°C)	Concentração de enzima	Enzima/origem	Referência
Romã	100-110	25-30	0,22-0,25 g/100 g de suco (protease:pectinase 1:2)	Pectinase Klerzyme 150 (DSM)	CERRETI et al., 2017
Banana	60	35	2% (m/v)	<i>In estudo</i>	BARMAN et al., 2014
Maçã	120	45	1 mL/50 g de maçã	<i>In estudo</i>	MAHMOODI; NAJAFPOUR E MOHAMMADI, 2017
Maçã	45	35	25 U/100mLde suco	Pectinex Ultra SP-L/ Novozymes 33095	POLETTO et al., 2015
Goiaba	40	45	0,078% (m/m)	Pectinase from <i>Aspergillus niger</i> (comercial)	NINGA et al., 2018
Jaboticaba	---	60	50 µL/Kg de jaboticaba	Pectinase Ultrazym AFPL (Novozymes)	PALUDO; KRÜGER, 2011
Tamarindo	360	37	5 mg/100 g	----	JOSHI et al., 2012
Abacaxi	30	40	0,02%	<i>In estudo</i>	DZOGBEFIA et al., 2001

Fonte: O autor (2018).

A indústria de sucos usa normalmente pectinases ácidas de origem fúngica, principalmente as provindas de *Aspergillus spp.* Extratos enzimáticos comerciais são frequentemente compostos de poligalacturonases, pectato liases e pectina esterases. Porém, pectinases que atuam na região dessesterificada de pectinas, podem requerer previamente a ação catalítica de enzimas que atuem em regiões esterificadas, como as pectina-esterase (SHARMA et al., 2014).

Enzimas poligalacturonases podem ser combinadas com enzimas β -glucanases e hemicelulases para a realização da clarificação de vinhos, pois auxilia nas etapas de maceração e, posteriormente na de filtração e, por conseguinte, no rendimento do produto final (BARRETO, 2016). Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de uma continuidade em pesquisas biotecnológicas voltadas à aplicabilidade de enzimas pectinolíticas para a indústria de sucos e bebidas.

3.2.5 Pectinases comerciais e patentes

A biotecnologia vem a contribuir para o avanço tecnológico em vários setores, sendo um deles a produção de enzimas. Para tanto, diversas pesquisas são realizadas para isolar e/ou utilizar microrganismos com potencial para a produção de moléculas de interesse. Paralelamente a isto, uma enorme gama de substratos pode ser utilizada para tal finalidade. Todavia, a finalidade primária que norteia estes estudos é a possibilidade de aplicações industriais dos produtos resultantes.

De modo a identificar a variedade de enzimas pectinolíticas disponíveis no mercado, foi realizada uma consulta na internet utilizando os termos “*pectinases comerciais*” e “*enzyme pectinase commercial*”. Os resultados localizados podem ser visualizados na Tabela 3.4.

TABELA 3.4 - EXEMPLOS DE ENZIMAS PECTINASES ENCONTRADAS COMERCIALMENTE E SEUS MICRORGANISMOS PRODUTORES

Origem/comercialização	Nome	Produção	Atividade
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Pectinase from <i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	-----
Enovin PECTINASE	Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	384,4(U/g)
Sigma	Pectinase from <i>Rhizopus sp</i>	<i>Rhizopus sp</i>	400-800(U/g)
Sigma	Pectinase from <i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1(U/mg)
Sigma (aqueous solution)	Pectinex® Ultra SPL	<i>Aspergillus aculeatus</i>	3.800(U/mL)

Fonte: O autor (2018).

Além da produção de enzimas industriais, o patenteamento de processos de obtenção também deve ser considerado etapa importante na execução de estudos nesta área, assegurando assim, o direito de propriedade intelectual do produto.

Atualmente, são encontrados pouquíssimos registros de patentes com uso de cascas de cacau e/ou enzimas pectinases provindas da produção por substratos na forma de resíduos agroindustriais. Em pesquisa feita na *internet* no sítio *Espacenet Patent Search* com os termos de busca “*cocoa shells*”, “*production of pectinases*” e “*cocoa shells and pectinase*”, temos JP2014176394 (A) (CHRONOPOULOS & ZUURBIER, 2014), que propõe em fornecer um alimento com um bom sabor de chocolate, compreendendo cascas de cacau alcalinizadas como uma valiosa fonte de nutrientes, e ainda um modelo de utilidade com cascas de cacau CN205865899 (U) (JIANMIN, 2017).

Sendo assim, vê-se uma enorme possibilidade científica e tecnológica para o emprego de cascas de cacau para a produção de pectinases.

3.3 PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS

3.3.1 Fermentação submersa com sólidos em suspensão (FESS)

A fermentação líquida e/ou submersa é a fermentação que utiliza como substratos caldos, melaços ou outros fluidos com constituintes próprios à fermentação de microrganismos. Os compostos bioativos que são produzidos na fermentação são secretados no próprio meio de cultivo. (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Essa técnica pode ser empregada com meios alternativos com sólidos em suspensão, sendo chamada de fermentação submersa com sólidos em suspensão (FESS) que permite o uso de subprodutos agroindustriais. Os subprodutos são moídos e classificados previamente de modo a se obter uma granulometria favorável ao processo (FERNÁNDES, 2009; KARP et al, 2013).

A fermentação submersa pode ser utilizada para produção de vários produtos de interesse biotecnológico. Enzimas industriais são usualmente produzidas por essa técnica. Alguns exemplos disso é a produção de enzimas amilases pelo de fungo filamentoso *Aspergillus niger* (Mathew et al, 2016) e, também a produção de enzima pectinases também por *A. niger* (Khairnar et al, 2009). (SINGHANIA et al., 2010).

Para garantir uma condição minimamente necessária à produção da enzima de interesse, indutores são adicionados ao meio de crescimento incluindo fontes ricas em pectina, como polpa de beterraba, casca de frutas cítricas ou bagaço de maçã

(VENKATESH E UMESH-KUMAR, 2005). Para tal, a técnica de FESS se adapta perfeitamente, pois propicia o uso de subprodutos diretamente sem necessidade de suplementação. A suplementação mineral também é necessária na forma de sais inorgânicos de forma a se alcançar taxas de crescimento mais altas (VENKATESH E UMESH-KUMAR, 2006). A capacidade de uma estirpe em sintetizar concentrações mais elevadas do produto de interesse depende não apenas do microrganismo selecionado, mas de toda a composição do meio (VANDENBERGHE et al., 2016). O conjunto de componentes contido no meio de cultura deve ser suficiente para atender as necessidades nutricionais dos microrganismos, sem que sejam prejudiciais nas etapas de recuperação dos produtos (SCHMIDELL, 2001).

Em trabalho para produção de pectinases realizado por Ahmed et al (2016), utilizou-se resíduos de casca de laranja em frascos inoculados com suspensão de esporos de *A. niger*, incubado a 30°C a 180 rpm e pH 5.5, obtendo uma produção com 117.1 µM/mL/min. A produção de pectinases por *Aspergillus fumigatus* em sistema de fermentação submerso tendo como substrato cascas de manga, foi realizada a 30°C (EZUGWU et al., 2012). *A. niger* foi utilizado em fermentação para produção de pectinases em biorreator com volume útil de 5 litros sob condições controladas de temperatura (30°C), pH (7,0) e agitação (200 rpm), obtendo-se uma atividade de 40.31±0.07 U/mL/min (KHAN et al., 2017). Outro exemplo de estudos para produção de pectinases foi o realizado por Yu; Zhang e Gu (2017), com *Bacillus subtilis* ZGL14, cultivado a 40°C e 200 rpm, com pH ótimo de 8,6. Neste trabalho a pectinase alcalina purificada atingiu atividade específica de 52372,52 U/mg.

3.3.2 Recuperação de enzimas

A recuperação e purificação de enzimas é etapa complexa dentro do processo de obtenção de tais biomoléculas e, uma maneira de garantir o sucesso da recuperação é a seleção de técnicas apropriadas que proporcionem as melhores condições de rendimento e pureza, em paralelo à diminuição do número de etapas necessárias para a purificação. A recuperação de enzimas pode envolver etapas de filtração, centrifugação, precipitação, microfiltração e ultrafiltração e etapas de purificação de maior resolução, como cromatografia, sendo necessário estudo

estratégico na escolha do método mais adequado à purificação (VANDENBERGHE et al., 2016).

Convencionalmente, adota-se a filtração simples, seguida de centrifugação nas etapas iniciais de recuperação de enzimas. O processo de centrifugação compreende a sedimentação por ação gravitacional de células e partículas em suspensão em um meio líquido. As células microbianas podem ser separadas do meio líquido por centrifugação, isto implica na vantagem de seguir com meio líquido mais clarificado para as etapas subsequentes de recuperação de biomoléculas (KILIKIAN, 2005). O processo de centrifugação depende do tamanho das partículas presentes no meio líquido, a concentração de sólidos em suspensão e da densidade dos sólidos suspensos (CARVALHO et al., 2017).

Seguidamente à etapa de centrifugação, o processo de precipitação é uma das técnicas mais tradicionais para separação de proteínas, sendo considerado um método de concentração utilizado previamente a métodos de maior resolução (LUCARINI et al., 2005). Um fator a ser considerado na escolha da precipitação como método de separação, é a viscosidade do meio contendo cascas de cacau devido à presença de pectina residual e outros componentes. Sem a precipitação, os procedimentos subsequentes de microfiltração e ultrafiltração do extrato enzimático seriam muito difíceis.

A precipitação por sais ocorre por neutralização das cargas superficiais da proteína e redução da camada de hidratação, favorecendo a agregação dos resíduos hidrofóbicos (LUCARINI et al., 2005). O processo de precipitação sob altas concentrações de sal é denominado *salting-out*. Neste, o aprisionamento de moléculas ocorre pela adição de sal. É interessante ressaltar que o processo de precipitação é conduzido preferencialmente sob baixas temperaturas, prevenindo o risco de desnaturação das proteínas (LUCARINI et al., 2005).

O sulfato de amônio é um sal ideal para o fracionamento de enzimas devido à sua alta solubilidade, baixa toxicidade a enzimas, e baixo custo e serve como conservante (VIJAYARAGHAVAN; RAJ E VINCENT, 2016). As principais vantagens da precipitação estão relacionadas à economia de custo de processo, uma vez que pode ser realizada com equipamentos simples, mesmo que de forma contínua e ao final do processo pode resultar em produtos estáveis em termos de armazenamento em longo prazo (HARRISON et al., 2015).

A filtração por membranas é outra estratégia adotada para a purificação de enzimas, na qual são utilizadas membranas de microfiltração e ultrafiltração. O princípio para os métodos de ultracentrifugação é a filtração por meio de uma membrana que tem um ponto de corte seletivo ao peso molecular, sendo assim, o extrato será filtrado com base no tamanho de partículas, não na carga (DAKO et al., 2012; VANDENBERGHE et al., 2016).

Estas membranas são caracterizadas pelo peso molecular de corte ("*cut off*"), que podem ser medidas de 1 kDa, 10 kDa, 100 kDa e 1.000 kDa. O *cut-off* representa o tamanho máximo da molécula que consegue permear pela membrana. A eficácia da separação por membrana irá depender do tipo da enzima, seu peso molecular e conformação, bem como a porosidade da membrana e seu material (FERNÁNDES, 2009; VANDENBERGHE et al., 2016). As vantagens da separação por membrana compreendem a economia de energia, uma vez que na maioria dos casos a separação ocorre sem a mudança de fase, a simplicidade de operação e possibilidade de purificar produtos de alto valor agregado e a especificidade (NOBREGA; BORGES; HABERT, 2005).

Tais estratégias na recuperação de enzimas podem ser utilizadas dentro dos processos de obtenção de enzimas pectinolíticas, cabendo ainda salientar a importância na escolha das etapas visando melhores resultados (AHMED et al. (2016; EZUGWU et al. 2012; FERNÁNDES, 2009; POLETTO et al., 2015).

Portanto, pode-se inferir que existem diferentes formas para obtenção de enzimas pectinolíticas, estas variações consistem desde a escolha do substrato até condições complexas de controle de processos, como pH, temperatura, agitação e seleção de micronutrientes. São essas variações que tornam possível a realização de grandes trabalhos biotecnológicos e a geração de produtos com valor agregado que possam contribuir ao desenvolvimento da sociedade nos mais variados aspectos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE CACAU

4.1.1 Recebimento e acondicionamento das cascas de cacau

As cascas de cacau que foram utilizadas para este trabalho são provenientes da região produtora de cacau do Estado do Pará, sendo o cacau da variedade Forastero e produzido na Fazenda Konagano, localizada em Ramal do Anuerá, s/n. Bairro: Quatro-Bocas. Tomé-Açu-PA (Figura 4.1) com coordenadas: atitude: 02° 25' 08" S Longitude: 48° 09' 08" W, gentilmente concedidas por intermédio da Universidade Federal do Pará, instituição parceira do Projeto CAPES PROCAD 2013 - BIOCAU.

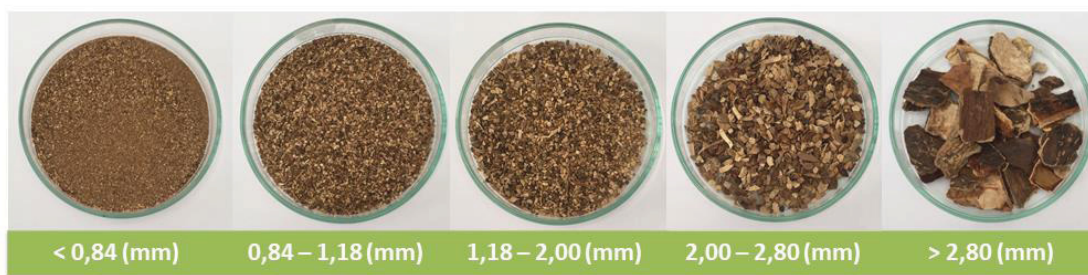
FIGURA 4.1 - LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO TOMÉ-AÇU-PA



FONTE: Adaptado de ABREU (2006).

As cascas foram recebidas nas instalações do CENBAPAR, no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. A biomassa foi recebida já seca e triturada. O material foi peneirado em peneirador com série de peneiras variando de <0,84 a >2,80 mm para a granulometria de retenção em cada peneira. Na Figura 4.2 estão apresentadas as cascas de cacau após classificação granulométrica.

FIGURA 4.2 - CASCAS DE CACAU E SUA CLASSIFICAÇÃO GRANULOMÉTRICA



FONTE: O autor (2018).

Após a separação e classificação granulométrica das cascas de cacau, foi realizada a caracterização físico-química bem como a caracterização lignocelulósica do material. Apenas as frações de tamanho 1,18-2,00 mm e menor do que 0,84 mm foram submetidas à caracterização. A menor fração, além de estar presente em maior quantidade, oferece maior área superficial de biodisponibilidade para degradação microbiana em processos fermentativos (NEGI E VIBHA, 2017). A fração de 1,18-2,00 mm, por ser a fração intermediária, pode ser igualmente utilizada como substrato para produção de enzimas pectinases. Todas as etapas de caracterização foram realizadas em triplicata e segundo as normas que são descritas a seguir.

4.1.2 Caracterização físico-química das cascas de cacau

Extrato aquoso

Um extrato aquoso foi preparado pela diluição de 1 g de casca em 20 mL de água ultrapura, homogeneizado e levado a ferver por 5 min. Após o resfriamento, o extrato foi filtrado e uma alíquota de 1 mL reservada.

Determinação do pH

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) do extrato aquosa das cascas de cacau, foi feita em aparelho pHmetro modelo LUCA-210 da Tecnopon. Antes de cada medição foi realização a devida calibração do aparelho com soluções tampão pH 4 e 7.

Determinação dos açúcares redutores solúveis

A determinação dos açúcares redutores foi feita pelo método do Ácido-Dinitro-Salicílico (DNS) (MILLER, 1959), tendo-se como padrão de curva a glicose. Em tubos de ensaio adicionou-se 0,5 mL de amostra juntamente com 0,5 mL de DNS. Os tubos foram incubados e levou a banho-maria sob ebulição durante 5 min, com a reação interrompida em banho de gelo. Ao final adicionou-se 5 mL de água deionizada em cada tubo, os quais foram em seguida homogeneizados. Para cada amostra foram preparados os brancos da reação com o DNS. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm.

Determinação de íons solúveis

Em seguida, os íons solúveis presentes nas cascas de cacau foram detectados a partir do equipamento *Ion Analysis Metrohm CH-9101*. Com a utilização de coluna *Metrosep C3 250/4.0* para cátions e *Metrosep A Supp 5 250/4.0* para ânions.

Determinação de proteínas totais solúveis

As proteínas totais solúveis foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando curva-padrão obtida com reagente de Bradford. Foram adicionados 5 µL da amostra e 195 µL do reagente em microplacas de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de microplacas modelo *Power wave X5* marca Biotek® a 595 nm.

4.1.3 Caracterização lignocelulósica das cascas de cacau

Determinação de umidade

A determinação da umidade das cascas de cacau foi realizada segundo o protocolo da NREL/TP-510- 42621 (SLUITER et al., 2008). Em cadinhos previamente secos e tarados, foram adicionados 2 g de cascas de cacau. As amostras foram colocadas em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 h para garantir que a amostra secasse até peso constante. A umidade foi calculada por diferença de massa, Equação 4.1

$$\% \text{ Umidade} = 100 - \left[\frac{(M_{ca} - M_c)}{M_a} \times 100 \right] \quad (4.1)$$

Onde:

M_{ca} = massa do cadinho com amostra após secagem

M_c = massa inicial do cadinho seco vazio

M_a = massa úmida de amostra

Determinação de cinzas

Para obter o percentual de cinzas presente nas cascas de cacau, foi seguido o protocolo da NREL/TP-510-42622 (Sluiter et al., 2008). Após obter o peso seco das amostras, as mesmas foram submetidas à calcinação a 350°C em mufla aberta. Em seguida, fechou-se a mufla para manter as amostras a 575°C durante 7 horas. As amostras foram inseridas em dessecador onde aguardou-se o seu resfriamento. Em seguida foi medida a massa em balança analítica. O teor percentual de cinzas foi obtido pela diferença de massa (g) das amostras, antes e após o processo de cinzas.

Determinação do teor de extraíveis

Para a determinação dos teores de extraíveis nas cascas de cacau, foi utilizado procedimento padrão TAPPI T 204 cm – 97 (2007). Inicialmente colocou-se no dedal de extração 5 g de amostra de casca para em seguida ser levado ao aparelho de extração tipo *Soxhlet*. O aparelho de extração tipo *Soxhlet* foi posicionado na vertical e encaixado sobre um frasco de fundo chato limpo e seco, contendo 150 mL de solvente, cuja massa foi previamente aferida. Os aquecedores foram mantidos de modo a fornecer uma temperatura adequada para o ciclo das extrações de acordo com tempo determinado para a ebulição de cada solvente. Passado o tempo de extração, retirou-se os frascos do aparelho e estes foram evaporados parcialmente até o solvente no frasco de extração atingir um volume de 20 a 25 mL. O conteúdo foi seco em estufa durante 1 hora a $100 \pm 3^\circ\text{C}$, e pesados com uma precisão de 0,1 mg. Os dedais de extração foram secos em estufa e pesados em seguida. As extrações foram realizadas com os solventes: éter de petróleo, álcool etílico e água destilada,

sequencialmente, com os respectivos tempos de refluxo de 6 h, 6 h e 3 h. A etapa de extração com água foi realizada em banho-maria. O percentual de extraíveis foi calculado pela Equação 4.2.

$$\% \text{ Extraíveis} = \frac{(MRE-MR)}{MAC} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde:

MRE = Massa do recipiente com extrativo

MR = Massa do recipiente

MAC = Massa da amostra corrigida

Determinação do teor de lignina

A determinação do teor de lignina foi realizada conforme proposto na norma NREL/TP-510-42618 de (2012). Inicialmente a biomassa foi seca a 40°C para retirada do excesso de umidade. Após a secagem da biomassa, pesou-se 0,3 g de casca de cacau e transferiu-se para frascos *Schott*. Adicionou-se 3 mL de H₂SO₄ 72% sobre as amostras. Os frascos foram levados para o banho-maria com temperatura controlada a 30°C, permanecendo no banho por 60 min. Durante este período, a mistura ácido/biomassa foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro, mexendo sempre em intervalos de 5 a 10 min. Ao fim dos 60 min, os frascos foram retirados do banho-maria. Adicionou-se a cada frasco 84 mL de água deionizada. Em seguida, os frascos foram levados para autoclave por 60 min a 121°C. Após o período de hidrólise, realizou-se uma filtração a vácuo, utilizando-se filtros de papel cuja massa inicial foi aferida previamente. O filtrado foi coletado para análise da lignina ácida solúvel por espectroscopia no ultravioleta (UV-VIS), calculada pela Equação 4.3 e análise dos carboidratos em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

$$C \text{ (g/L)} = \frac{4,53.(Al-Ac)}{300} \quad (4.3)$$

Onde *A_I* e *A_C* correspondem, respectivamente, à absorvância em 205 e 280 nm (SILVA, 2005).

O resíduo ácido insolúvel foi levado à estufa a 40°C para secagem da biomassa até peso constante. Em seguida, o material foi levado à mufla durante 6 h a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ para a análise das cinzas desse resíduo que ficou retido no filtro, visando-se obter um fator de correção em relação ao percentual de lignina ácida insolúvel.

Determinação de carboidratos estruturais

Os carboidratos estruturais foram determinados de acordo com NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2011). Foram preparadas soluções padrão de glicose, xilose e arabirose. As amostras provenientes do ensaio de determinação de lignina solúvel foram neutralizadas até pH 6-7 utilizando-se carbonato de cálcio, seguido de homogeneização. Terminada a neutralização, as amostras foram filtradas em filtro de membrana de porosidade 0,2 µm e transferidas para tubo *vial*. Por fim, as amostras foram analisadas em HPLC.

4.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES

4.2.1 Preparo de inóculo

O inóculo foi preparado da seguinte maneira: foram pesados 60 g de arroz branco e levados a cocção por 10 min. Os grãos de arroz cozido foram coados, dispostos em frascos de Erlenmeyer e levados para esterilização em autoclave por 15 min a 121°C e 1 atm. Em seguida, inoculou-se o arroz com suspensão de esporos do microrganismo, a partir de tubo inclinado, e depois os frascos foram incubados em estufa por até seis dias a 30°C.

A suspensão de esporos utilizada para inocular os frascos de fermentação foi obtida pela suspensão dos esporos cultivados em grãos de arroz nos frascos Erlenmeyer, em solução de água deionizada e contendo 1 gota de Tween 80 previamente esterilizada, após agitação e filtração.

Para contagem dos esporos, foram realizadas diluições sucessivas da suspensão de esporos e a contagem destes em câmara de Neubauer com auxílio microscópio óptico. Foi utilizada uma suspensão com concentração de 1×10^7 esporos/mL para cada frasco com meio de fermentação.

4.2.2 Manutenção e conservação do microrganismo

A manutenção do microrganismo foi realizada por técnica de repicagem em estrias em tubo inclinado contendo meio PDA (Potato-Dextrose-Ágar). Os tubos repicados foram incubados em estufa durante sete dias a 30°C . Após o tempo de incubação estes foram levados a geladeira para conservação em temperatura de 4°C .

4.2.3 Meio de produção de pectinases

O meio de cultura utilizado inicialmente e tomado por controle durante os testes de otimização foi composto por: casca de cacau 50,0; Glicose 5,0; Extrato de levedura 0,05; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0; MgSO_4 0,5; KH_2PO_4 2,5; FeSO_4 $6,3 \times 10^{-4}$; ZnSO_4 $6,2 \times 10^{-4}$; MnSO_4 $1,0 \times 10^{-5}$, com valores correspondentes a concentração em (g/L), conforme Reginatto et al (2017) com substituição da pectina comercial por cascas de cacau.

4.2.4 Seleção de cepas produtoras de pectinases em meio de cultivo sintético

Visando selecionar microrganismos com potencial para produção de enzimas pectinases, realizou-se a seleção dentre cepas de microrganismos do gênero *Aspergillus* do banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Na Tabela 4.1, é apresentada a relação de cepas testadas inicialmente.

TABELA 4.1 - MICRORGANISMOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE PECTINASES

Microrganismos avaliados	
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 594	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2270
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 593	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 1278
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 511	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 334
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 328
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3312	<i>Aspergillus niger</i> CCT 7716
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2001	

FONTE: O autor (2018)

Os experimentos de fermentação foram conduzidos utilizando-se meio de cultivo sintético (REGINATTO et al., 2017) composto por: pectina (Sigma) 20,0; Glicose 5,0; Extrato de levedura 0,05; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0; MgSO_4 0,5; KH_2PO_4 2,5; FeSO_4 $6,3 \times 10^{-4}$; ZnSO_4 $6,2 \times 10^{-4}$; MnSO_4 $1,0 \times 10^{-5}$, com valores correspondentes a concentração em (g/L). Os cultivos para fermentação foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, incubados a 28°C durante 120 h.

4.2.5 Seleção de cepas produtoras de pectinases em meio contendo cascas de cacau

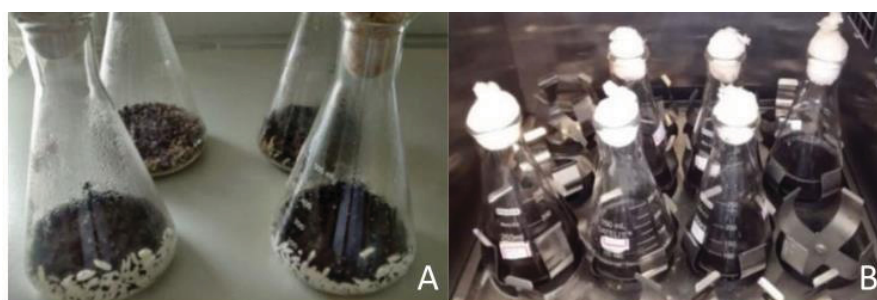
Após a realização da seleção de microrganismos previamente realizada utilizando-se o meio de cultivo sintético, foram selecionadas cinco melhores cepas: *A. niger* NRRL 3; NRRL 2001; NRRL 2270; NRRL 328 e CCT 7716. Estas cepas foram então cultivadas utilizando-se o meio de cultivo anterior, mas substituindo-se a pectina pela casca de cacau com concentração de 5% (m/v) e granulometria abaixo de 0,84 mm.

Por fim, a melhor cepa com potencial para produção da enzima de interesse foi selecionada para a realização das etapas seguintes de estudo. Após as etapas de seleção de microrganismo adotou-se para uso deste trabalho a cepa *A. niger* NRRL 2270. A cepa escolhida apresentou melhor potencial para produção de enzimas pectinases.

4.2.6 Procedimento de fermentação

Os cultivos para fermentação (Figura 4.3) foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, incubados a 28°C durante 120 h. Os frascos foram dispostos em incubadora tipo *shaker* de bancada refrigerada. Os experimentos foram conduzidos em duplicata ou triplicada, conforme etapas descritas adiante.

FIGURA 4.3 - FERMENTAÇÃO DO *Aspergillus niger* REALIZADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER



FONTE: O autor (2018).

4.2.7 Recuperação e separação de pectinases

Após o período de fermentação, as amostras foram retiradas dos frascos e filtradas em tecido tipo TNT para facilitar a filtração em decorrência da alta viscosidade do meio fermentado. Em seguida, o filtrado foi centrifugado durante 15 min a 3500 rpm. Terminada a centrifugação separou-se o sobrenadante e descartou-se o precipitado e, então, as amostras foram congeladas a -18°C até o momento de realização das análises.

4.2.8 Determinação da atividade pectinase

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a determinação de atividade de poligalacturonase (PG). O método foi realizado de acordo Handa et al (2016) com modificações. A determinação dos açúcares redutores foi feita usando o método do Ácido-Dinitro-Salicílico (DNS) (MILLER, 1959), tendo-se como padrão o ácido galacturônico (Sigma). Em microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL, adicionou-se 330 µL de solução de pectina (Sigma) a 0,5% (m/v) preparada em tampão citrato 0,1M

e pH 4,0, juntamente com 45 μL de amostra da enzima diluída. Incubou-se as amostras durante 15 min a 50°C em banho-maria. Passado o tempo, a reação foi interrompida em banho de gelo e adicionou-se 375 μL de DNS em cada microtubo e levando-os ao banho-maria sob ebulição durante 5 min, interrompendo-se a reação com banho de gelo. Ao final adicionou-se 750 μL de água deionizada em cada microtubo homogeneizando-os. Para cada amostra foram preparadas reações de branco: o branco da reação com DNS; o branco para absorbância do substrato e também para absorbância da amostra de enzima. As absorbâncias das amostras foram lidas em leitor de microplacas modelo *Power wave X5* marca Biotek® a 540 nm. Uma unidade de atividade PG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido D-galacturônico por minuto a 50°C e pH 4,0.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

As etapas de otimização da produção de pectinases foram realizadas tendo por base o meio de cultivo utilizado nas etapas de seleção dos microrganismos, tendo como única diferença a substituição do uso de pectina (da composição do meio sintético) pelo uso da casca de cacau na concentração 5% (m/v) e de granulometria abaixo de 0,84 mm. Este meio foi denominado “meio de cultivo controle”, sendo apresentado na Tabela 4.2.

Esta substituição teve como objetivo a incorporação das cascas de cacau ao meio sintético, de modo que esta biomassa constituísse a fonte de pectina do meio. Ainda, o uso das cascas de cacau nos desenhos experimentais torna possível o entendimento do comportamento deste, frente aos efeitos de interações e concentração.

TABELA 4.2 - MEIO DE CULTIVO CONTROLE UTILIZANDO CASCAS DE CACAU

Componente	Concentração (g/L)
Casca de cacau	50
Glicose	5
Extrato de levedura	0,05
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
MgSO_4	0,5
KH_2PO_4	2,5
FeSO_4	$6,3 \times 10^{-4}$
ZnSO_4	$6,2 \times 10^{-4}$
MnSO_4	$1,0 \times 10^{-5}$

FONTE: O autor (2018).

As estratégias de otimização da produção de pectinases, as quais foram realizadas são apresentadas a seguir, com o propósito de determinar condições mais adequadas à produção das enzimas de interesse.

4.4.1 Primeira etapa de otimização - Seleção de componentes do meio para a produção de pectinases - Planejamento Plackett & Burman

O planejamento Plackett & Burman é utilização em situações em que existe um grande número de variáveis, e deseja-se selecionar aquelas que influenciam de modo significativo um dado processo, variando-se os componentes de forma independente para avaliar separadamente o efeito de cada fator (PLACKETT & BURMAN, 1946).

O planejamento foi realizado com sete fatores e oito ensaios em dois níveis e três repetições no ponto central, em um total de 11 experimentos. Os fatores testados foram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, com cascas de cacau a 5% e as mesmas condições de temperatura, pH e agitação dos ensaios controle. Na Tabelas 4.3, os níveis codificados e decodificados estudados no planejamento.

TABELA 4.3 - NÍVEIS CODIFICADOS E DESCODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT & BURMAN

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	2,5	5
MgSO ₄	0	0,025	0,5
KH ₂ PO ₄	0	1,25	2,5
ZnSO ₄	0	3,1x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴
MnSO ₄	0	5,0x10 ⁻⁶	1,0x10 ⁻⁵
FeSO ₄ .7H ₂ O	0	3,15x10 ⁻⁴	6,3x10 ⁻⁴
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0	2,5	5

FONTE: O autor (2018).

4.4.2 Teste de seleção da fonte de nitrogênio

Buscando-se selecionar a melhor fonte de nitrogênio para a produção de pectinases com cascas de cacau, foram realizados ensaios variando-se a fonte de nitrogênio do meio: Casca de cacau (50 g.L⁻¹), Glicose (5 g.L⁻¹), Extrato de levedura (0,05 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (5 g.L⁻¹), MgSO₄ (0,05 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2,5 g.L⁻¹), FeSO₄ (6,3x10⁻⁴ g.L⁻¹), ZnSO₄ (6,2x10⁻⁴ g.L⁻¹), MnSO₄ (1,0x10⁻⁵), mas buscando-se manter o equivalente de nitrogênio das demais fontes testadas com o meio padrão. Na Tabela 4.4 estão apresentadas as diferentes fontes de nitrogênio testadas, bem como suas respectivas concentrações

TABELA 4.4 - FONTES DE NITROGÊNIO TESTADAS PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Fonte de Nitrogênio	Concentração (g/L)
1*	Extrato de levedura (NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 5
2	Extrato de levedura	10,55
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,02
4	(NH ₂) ₂ CO	2,26
5	NH ₄ Cl	4,03
6	(NH ₂) ₂ CO (NH ₄) ₂ SO ₄	1,12 2,47

* Meio de cultivo controle. FONTE: O autor (2018).

4.4.3 Terceira etapa de otimização - Planejamento experimental fatorial incompleto do tipo $2^{(4-1)}$ para determinação das concentrações dos fatores significativos

Visando determinar os fatores que melhor influenciam na resposta atividade enzimática, bem como suas concentrações mais adequadas, foi aplicado um planejamento experimental incompleto $2^{(4-1)}$.

O planejamento foi conduzido com 4 fatores e 8 ensaios em 2 níveis: inferior e superior, mais 3 repetições no ponto central. Os fatores testados foram: Glicose, Extrato de levedura, $MgSO_4$ e KH_2PO_4 . Fixou-se a casca de cacau 50 g/L e $ZnSO_4$ $6,2 \times 10^{-4}$ g/L. Nas Tabelas 4.5 e 4.6, encontram-se a matriz do planejamento estudado e os fatores estudados com os níveis codificados e decodificados, respectivamente.

TABELA 4.5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(4-1)}$ – ESTUDO DO EFEITO DOS FATORES E CONCENTRAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Fatores			
	Glicose	Extrato de levedura	$MgSO_4$	KH_2PO_4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9 (C)	0	0	0	0
10 (C)	0	0	0	0
11 (C)	0	0	0	0

FONTE: O autor (2018).

TABELA 4.6 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO 2⁽⁴⁻¹⁾

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
Glicose	5	10	15
Extrato de levedura	3	3,33	3,6
MgSO ₄	0,5	1	1,5
KH ₂ PO ₄	2,5	3,5	4,5

FONTE: O autor (2018).

Os níveis (-1), (0) e (+1) das variáveis Glicose e Extrato de levedura, foram determinados de modo que: os níveis inferiores de Glicose e Extrato de levedura, quando combinados perfazem uma relação Carbono/ Nitrogênio 10:1. Quando combinado o ponto central também destas variáveis, obtêm-se uma relação C/N 15:1 e a combinado dos níveis superiores resulta em uma relação C/N 20:1.

A relação C/N presente neste desenho experimental foi feita tendo por base a fração de carbono presente nos açúcares redutores solúveis presentes na casca de cacau juntamente à fração de carbono presente na glicose adicionada ao meio de cultivo. A fração de nitrogênio presente no extrato de levedura (3 g/L) adicionado ao meio de cultivo foi considerada como fonte de nitrogênio para o desenho experimental.

4.4.4 Testes complementares à otimização da composição do meio de produção de pectinases

Ensaio complementares aos planejamentos experimentais foram realizados, tendo-se como meta o estudo do efeito de diferentes composições do meio sobre a atividade enzimática. Os ensaios realizados são descritos na Tabela 4.7.

TABELA 4.7 - CONDIÇÕES DOS ENSAIOS COMPLEMENTARES PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Componentes do meio de produção (g/L)									
	Casca cacau	Glicose	Extrato levedura	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	FeSO ₄	ZnSO ₄	MnSO ₄	(NH ₂) ₂ CO
1*	50	5	0,05	5	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0
2	50	0	0,05	5	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0
3	50	0	10,55	0	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0
4	50	0	0	0	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	2,26
5**	50	0	0,05	5	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0
6	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Meio controle

** Meio preparado à base de extrato de pectina

Os ensaios foram conduzidos da seguinte maneira: o ensaio de número 1 foi composto pelo meio de produção controle. Os demais ensaios foram realizados sem a presença de glicose, objetivando-se estudar o efeito da casca de cacau como única fonte de carbono sobre a atividade enzimática. O ensaio de nº 3 foi realizado com o uso de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, já que este apresentou-se como melhor fonte de nitrogênio. O ensaio quatro foi realizado com (NH₂)₂CO como fonte de nitrogênio, uma vez que este apresentou-se como segunda melhor fonte de nitrogênio. Para o ensaio de nº 5, o meio foi preparado à base de uma solução de pectina (50 g/L) extraída da casca de cacau em banho-maria à 100°C por 20 min e, posteriormente, filtrada, onde adotou-se a denominação de extrato de pectina. Por fim, o ensaio de nº 6 foi realizado apenas com o uso da casca de cacau. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.5 Matriz do planejamento fatorial incompleto 3⁽³⁻¹⁾ - Estudo do efeito dos fatores e concentrações sobre a produção de pectinases

O experimento fatorial incompleto do tipo 3⁽³⁻¹⁾ foi proposto a fim de identificar quais fatores influenciam significativamente a produção de pectinases, com base nos estudos anteriores. Nas Tabelas 4.8 e 4.9, tem-se a matriz experimental e níveis codificados e decodificados de cada fator estudado.

TABELA 4.8 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $3^{(3-1)}$ – ESTUDO DO EFEITO DOS FATORES E CONCENTRAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Fatores		
	Casca de cacau	Extrato de levedura	Extrato de pectina
1	-1	-1	-1
2	-1	0	1
3	-1	1	0
4	0	-1	1
5	0	0	0
6	0	1	-1
7	1	-1	0
8	1	0	-1
9	1	1	1
10 (C)	0	0	0
11 (C)	0	0	0

FONTE: O autor (2018).

TABELA 4.9 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO $3^{(3-1)}$

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
Casca de cacau	25	50	75
Extrato de levedura	0,0	0,05	0,10
Extrato de pectina	0,0	50	75

FONTE: O autor (2018).

4.4.6 Matriz experimental do planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional - Estudo do efeito dos fatores e concentrações sobre a produção de pectinases

Um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado, acrescido de triplicada no ponto central. Esta etapa teve por objetivo a investigação da influência dos fatores: concentração de casca de cacau e concentração de extrato de pectina sobre a produção de pectinases. Na Tabela 4.10 encontram-se os valores codificados para a matriz de planejamento, na

qual consistiu o desenho dos experimentos e na Tabela 4.11 os níveis codificados e descodificados.

TABELA 4.10 - MATRIZ EXPERIMENTAL DO DELINEAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL PARA ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Fatores	
	Casca de cacau	Extrato de pectina
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,414	0
6	1,414	0
7	0	-1,414
8	0	1,414
9 (C)	0	0
10 (C)	0	0
11 (C)	0	0

FONTE: O autor (2018).

Estes fatores foram selecionados tendo por base os resultados do planejamento experimental anterior ($3^{(3-1)}$). Para este delineamento adotou-se como ponto central as concentrações de casca de cacau e extrato de pectina que propiciaram melhor resposta em termos de produção de pectinases do experimento anterior.

Adotou-se ainda, de modo fixo, uma concentração de extrato de levedura de 0,05 (g/L). Esta concentração é a mesma utilizada no meio de produção controle e, tendo em vista que os testes anteriores apontam esta variável como significativa, porém em baixas concentrações, optou-se por adotar esta concentração, ademais, uma baixa concentração de componentes do meio também tem por consequência positiva economia financeira.

TABELA 4.11 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DOS FATORES ANALISADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Variáveis (g/L)	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Casca de cacau	39,75	50	75	100	110,25
Extrato de pectina	36	40	50	60	64

FONTE: O autor (2018).

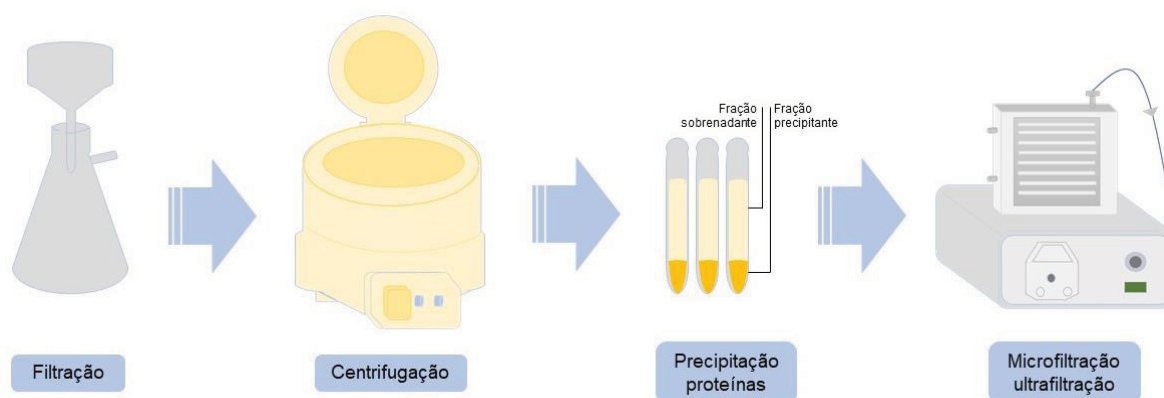
4.5 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA ENZIMA PECTINASE

A cinética do processo de produção da enzima visou determinar a evolução da produção da enzima pectinase ao longo do tempo. Para tanto, realizou-se a fermentação em meio de cultivo em condições otimizadas durante 168 h, coletando-se amostras para a determinação da atividade enzimática em intervalos de 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA ENZIMA

As etapas de separação e recuperação da pectinase executadas no trabalho, estão ilustradas na Figura 4.4.

FIGURA 4.4 - ETAPAS DE SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA ENZIMA



FONTE: O autor (2018).

4.6.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônio

Realizou-se o processo de precipitação utilizando o sulfato de amônio como agente precipitante. Foram realizadas precipitações nas amostras do extrato enzimático obtido logo após processo fermentativo. Foram utilizadas as faixas de saturação com sulfato de amônio de 60%, 70% e 80%. Os experimentos foram realizados em triplicata e as amostras foram mantidas em banho de gelo durante todo o processo de precipitação (PEDROLI, 2008).

Terminada esta etapa, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada durante 15 min a 4000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi separado e precipitado e este foi resuspenso em tampão citrato 0,1 M e pH 4,0 e homogeneizado. Foram determinadas a atividade de pectinase dos precipitados obtidos e também no sobrenadante. As frações do precipitado contendo as pectinases foram filtradas a vácuo em papel filtro para separação de partículas em suspensão e, em seguida, foram levadas ao processo de filtração por micro e ultrafiltração em membranas.

4.6.2 Processo de separação de pectinases por membranas

Para o processo de separação e purificação por microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) do extrato enzimático contendo as enzimas pectinases produzidas, foi utilizado um sistema de filtração tangencial *VivaFlow 200* (Sartorius Stedim, Alemanha). O sistema é equipado com bomba peristáltica conectada a um limitador de fluxo e o indicador de pressão para cassetes e reservatórios de membrana de polietersulfona (PES). Foram empregadas uma membrana de MF (0,2 μm de tamanho de poro), e uma membrana de UF com *membrane weight cut-off* (MWCO) de 30 kDa.

Inicialmente, as membranas foram lavadas por meio de bombeando com aproximadamente 500 mL de água ultrapura para a remoção da solução de armazenamento das membranas. Logo em seguida ao uso das membranas, as mesmas foram limpas com a recirculação de água ultrapura e solução de limpeza e novamente a solução de armazenamento foi reintroduzida em cada membrana utilizada.

O processo de filtração foi realizado à temperatura ambiente, entretanto, as amostras na corrente de alimentação, na corrente de filtração e no retentado foram mantidas em banho de gelo. Um volume de amostra foi utilizado para cada experimento. Durante o processo de filtração a pressão transmembranar foi mantida em até 1 bar. Com o auxílio de provetas graduadas foi verificado o volume de amostras durante cada etapa do processo, para posterior realização de determinação dos seguintes fatores para cada fração de permeado e retentado obtidas: atividade enzimática (AtE), atividade específica (AE), % de recuperação e fator de purificação (*fold purification*).

A atividade específica (Equação 4.4) é a razão entre atividade enzimática (AtE) e a concentração de proteínas (Pt), obtidas após etapa de recuperação em membrana e, expressa em (U/mg).

$$AE = \frac{AtE}{Pt} \quad (4.4)$$

O percentual de recuperação representa o desempenho do processo de UF (POLETTTO et al., 2015). É expresso pela razão entre a atividade total da corrente de saída (AT_{cs}) pela atividade total da corrente de entrada (AT_{ce}), sendo determinado pela Equação 4.5.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{AT_{cs}}{AT_{ce}} \quad (4.5)$$

O fator de purificação ou *fold purification*, calculado pela Equação 4.6, representa a eficiência do processo de UF, sendo a razão entre a atividade específica do concentrado e o extrato inicial (POLETTTO et al., 2015).

$$\text{Fold purification} = \frac{AE_{\text{concentrado}}}{AE_{\text{extrato inicial}}} \quad (4.6)$$

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

4.7.1 Determinação do perfil de atividade de pectinases em diferentes temperaturas e pHs

Temperatura

A determinação do perfil de temperatura foi realizada para verificar qual a melhor condição ou condições de temperatura para a qual a atividade da enzima em estudo (pectinases), tem maior ou menor expressão.

A temperatura utilizada nos ensaios padrão deste trabalho é de 50°C. Entretanto, para a determinação da região de temperatura ótima, o ensaio consistiu na incubação do extrato enzimático, não formulado, em temperaturas entre 20 e 90°C, com intervalos de 10°C.

A expressão da atividade enzimática foi determinada em termos de atividade relativa, ou seja, uma relação entre a atividade enzimática obtida na temperatura do ponto avaliado e a maior atividade obtida. Os testes nas temperaturas supracitadas foram realizados simultaneamente e em triplicata.

pH

A determinação do perfil de pH foi realizada para verificar qual ou quais a(s) melhor(es) condição(ões) de pH onde a atividade da enzima em estudo (pectinases), tem maior ou menor expressão.

O pH no qual as reações acontecem nos ensaios padrão deste trabalho é pH = 4,0, entretanto, para a determinação do perfil de pH, diferentes valores de pH entre 3,0 e 10,0 foram testados, com intervalos de 1,0, com o tamponamento do extrato enzimático. As diluições das amostras foram realizadas nas respectivas soluções-tampão associadas ao pH analisado. Na Tabela 4.12, é apresentado os tipos de solução-tampão utilizados no teste.

TABELA 4.12 - SOLUÇÕES-TAMPÃO PARA VARIADOS pH'S

Solução-tampão	pH
	3
	4
Citrato-fosfato	5
	6
	7
Fosfato	8
	9
Glicina-NaOH	10

FONTE: O autor (2018).

A expressão da atividade foi determinada em termos de atividade relativa, e a temperatura de incubação foi a mesma adotada nos ensaios padrão deste trabalho (50°C). Os testes nos pHs supracitados foram realizados simultaneamente e em triplicata.

4.7.2 Influência de íons sobre a atividade de pectinase

A sensibilidade das enzimas pectinases a variadas substâncias (cátions e ânions) foi avaliada por meio da incubação do extrato enzimático não formulado e diluído em solução de tampão citrato pH 4,0, na presença das seguintes substâncias Pedrolli (2008): EDTA, KCl, BaCl₂, citrato de sódio, CoCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, NH₄Cl, MnSO₄, FeSO₄. As concentrações testadas para cada substância foram 5 e 10 mM. Em seguida foi determinada a atividade enzimática conforme descrito anteriormente.

4.7.3 Determinação de parâmetros cinéticos

Cinética de Michaelis-Menten

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade de pectinases foi determinado incubando-se a enzima em diferentes concentrações de solução de pectina como substrato (0,05 a 1,5% (m/v)). As constantes Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima das reações (V_{max}) foram estimadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver & Burk (1934).

Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima foi estudada nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80°C. Para este estudo, a enzima foi incubada em cada temperatura até que perdesse 50% de sua atividade inicial. A medida da atividade enzimática foi feita conforme descrito anteriormente, em intervalos de tempos pré-determinados.

Meia vida

A meia vida da enzima foi calculada conforme Lavorenti et al. (2003), a partir da Equação 4. 7.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (4.7)$$

Constante cinética de desnaturação térmica

Os valores experimentais de K_d foram determinados por meio do coeficiente angular do gráfico $-\ln (V/V_0)$ versus o tempo de incubação da amostra, em que V é a atividade enzimática em cada tempo de amostragem e V_0 é a atividade enzimática no tempo inicial ($t = 0$) conforme (HEIDTMANN et al., 2012).

Energia da reação de desativação

A partir dos dados da estabilidade térmica, determinou-se por meio do coeficiente angular da reta $-\ln (K_d)$ versus $1/T$ e utilizando-se a Equação 4.8, o valor de E_d , em que R é a constante dos gases ideais ($8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

$$\ln k_d = \ln K - \left(\frac{E_d}{RT} \right) \quad (4.8)$$

Determinação dos valores D e z

O valor de redução decimal D é o tempo necessário para reduzir a velocidade de reação a 10% e foi determinado pela Equação 4.9. A variação de temperatura (valor z) foi obtida pelo inverso do coeficiente angular da reta construída a partir de log (D) versus temperatura (°C) (HEIDTMANN et al., 2012).

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (4.9)$$

4.8 FORMULAÇÃO LÍQUIDA E ESTABILIDADE DE PECTINASES

A pré-seleção dos aditivos e as concentrações testadas para a formulação do extrato enzimático pectinolítico conforme LIBARDI, 2018, ANVISA, 2007 e ANVISA, 2014. Os aditivos testados estão apresentados na Tabela 4.13.

TABELA 4.13 - ADITIVOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DE FORMULAÇÃO DE PRODUTO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO E SUAS CONCENTRAÇÕES

Função	Aditivo	Concentração (m/v)
Poliol	Sorbitol	54,6
Ácido	Ácido benzoico	0,05
Sal	Benzoato de sódio	0,25
Poliol	Xilitol	45,6

FONTE: O autor (2018).

Nos testes iniciais os aditivos foram adicionados a microtubos termorreristentes, mantendo pelo menos metade do *headspace*. Os experimentos de estabilidade acelerada foram conduzidos em triplicata, com a incubação dos frascos a 50°C durante 14 dias. As determinações das atividades enzimáticas foram realizadas a cada intervalo de 3 dias.

Na segunda etapa, dois aditivos selecionados (Benzoato de sódio e xilitol) foram combinados em delineamento experimental fatorial 2² com 3 pontos centrais em um total de 7 experimentos, (Tabela 4.14). O software Statistica® 7.0 (Statsoft, USA) foi empregado para geração da matriz do planejamento experimental.

TABELA 4.14 - NÍVEIS CODIFICADOS E DESCODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2² PARA FORMULAÇÃO DO EXTRATO DE PECTINASES

Variável	Níveis % (m/v)		
	-1	0	+1
Benzoato de sódio	0,1	0,25	0,4
Xilitol	35,5	45,5	55,5

FONTE: O autor (2018).

Por fim, os aditivos selecionados (benzoato de sódio e xilitol) foram utilizados no teste de estabilidade à longo prazo, realizados durante 60 dias a 4°C.

4.9 APLICAÇÃO DA PECTINASE PRODUZIDA NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ

4.9.1 Clarificação enzimática do suco de maçã

Para os ensaios de clarificação enzimática foram utilizadas maçãs Fuji adquiridas em supermercado local. Inicialmente, as maçãs foram lavadas em água corrente, cortadas e trituradas em aparelho liquidificador, juntamente com água deionizada na proporção de 250 mL de água para cada 4 maçãs. Simultaneamente à extração, adicionou-se metabisulfito de sódio (0,1%) para evitar o escurecimento enzimático (OLIVEIRA et al, 2018). Após a extração do suco o mesmo foi congelado a -18°C até o momento da reação de clarificação.

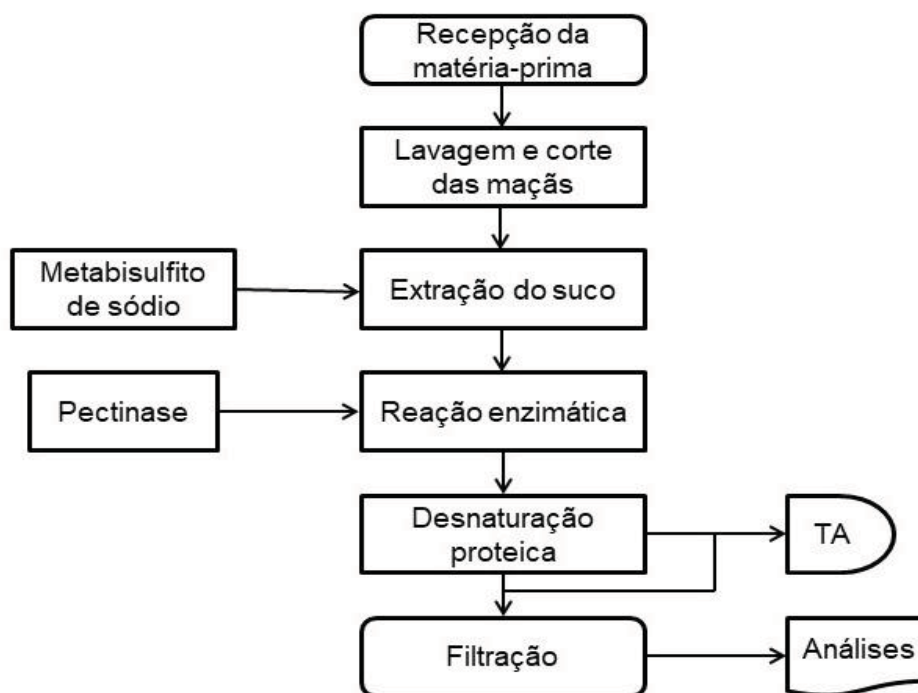
O processo de clarificação foi realizado da seguinte maneira: em frascos de Erlenmeyer foram adicionados 50 mL do suco previamente extraído juntamente com 10 mL de extrato enzimático não formulado na concentração de 450 U/mL. Preparou-se uma amostra com adição do produto enzimático produzido neste trabalho (CauPec), uma amostra com adição de enzima pectinase comercial (Pectinase *from Aspergillus niger* - Sigma) e uma amostra com adição do volume corresponde à enzima substituído por água deionizada, sendo este o branco do ensaio. Os frascos foram levados à incubação em banho-maria com agitação orbital à 50°C durante 60 min. Passado este tempo, os frascos foram incubados à 85°C durante 15 min para

inativação das enzimas. Por fim, os frascos foram levados a banho de gelo até atingirem temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram filtradas à vácuo com utilização de papel filtro qualitativo.

Um novo teste foi realizado de modo a observar o comportamento das enzimas, tendo-se realizado de maneira semelhante ao descrito acima, apenas com alteração no tempo de reação enzimática, aumentando-se para 120 min de reação.

Na Figura abaixo (4.5) está apresentado um fluxograma do processo de clarificação realizado neste trabalho.

FIGURA 4.5 - FLUXOGRAMA DE PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ



TA: Etapa na qual o suco processado deverá ficar em banho frio até atingir temperatura ambiente.

FONTE: O autor (2018).

4.9.2 Análises das amostras após clarificação enzimática

Vazão

As vazões de todas as amostras foram determinadas após a filtração a vácuo, onde os tempos de filtração (t) e os respectivos volumes (v) foram registrados. A vazão foi calculada pela Equação 4.10.

$$V = \frac{v}{t} \quad (4.10)$$

Turbidez

A turbidez é compreendida como uma propriedade física dos fluidos, onde a presença de partículas suspensas interfere na transparência do líquido. E para determinação desta variável foi utilizado um turbidímetro digital da marca PoliControl modelo AP2000.

pH

A determinação do pH das amostras foi feita em aparelho pHmetro modelo LUCA-210 da Tecnozon. Antes de cada medição foi realizada a devida calibração do aparelho com soluções tampão pH 4 e 7.

Viscosidade

A viscosidade de um fluido corresponde à sua resistência à deformação ou ao escoamento. A viscosidade absoluta da amostra, ou também chamada de coeficiente de viscosidade dinâmica, foi determinada pela Equação 4.11. Para tanto, utilizou-se um viscosímetro de Ostwald para determinação dos tempos de escoamento das amostras. Os cálculos de viscosidade foram feitos tomando-se como referência água deionizada.

$$\mu = \frac{\mu_{H_2O.(t,p)}}{t_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}} \quad (4.11)$$

Brix

As leituras de sólidos suspensos totais foram realizadas em aparelho Refratômetro Manual com escala de leitura de 0 a 32 Brix. Com os valores expressos em °Brix.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE CACAU

Os resíduos agroindustriais são compostos principalmente de polissacarídeos complexos que contribuem ao fortalecimento e o crescimento microbiano na produção de enzimas industrialmente importantes, (AHMED et al. 2016). Diante disso, é de grande importância determinar a composição das matérias-primas utilizadas como substratos. A composição dos parâmetros físico-químicos das cascas de cacau correspondentes às granulometrias classificadas em < 0,84 e de 1,18 a 2,00 mm está apresentada na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E LIGNOCELULÓSICA DE CASCAS DE CACAU (*Theobroma cacao*)

Granulometria (mm)	1,18 - 2,0	< 0,84
Composição físico-química (mg/g)		
Açúcares solúveis	29,56 ± 4,65	50,73 ± 3,90
Proteínas solúveis	7,36 ± 0,48	7,08 ± 0,05
pH	5,46 ± 0,03	5,44 ± 0,05
Composição lignocelulósica (%)		
Umidade	5,14 ± 0,02	5,15 ± 0,05
Cinzas	6,11 ± 0,09	7,86 ± 0,11
Extraíveis	18,11 ± 0,67	17,73 ± 0,32
Lignina	41,28 ± 0,63	38,79 ± 1,65
Hemicelulose	8,97 ± 2,61	9,20 ± 0,68
Celulose	22,29 ± 1,94	18,83 ± 2,75

FONTE: O autor (2018).

A partir dos dados, observa-se que as cascas com granulometria < 0,84 mm apresentaram concentração de açúcares solúveis maiores naquelas com granulometria entre 1,18 a 2,0 mm. Uma maior concentração de açúcares solúveis é interessante para nutrição dos microrganismos durante o processo fermentativo,

considerando que estes açúcares já estão biodisponíveis sem a necessidade de etapas de pré-tratamento.

Entretanto, os valores apresentados para proteínas solúveis e pH são bastante semelhantes em ambas as granulometrias de casca. As proteínas solúveis são também de importância nutricional, uma vez que peptídeos e proteínas podem ser absorvidos pelas células e assim assimilados pelos microrganismos (GALVAGNO E FORCHIASSIN, 2010).

Na caracterização de cacau (*Theobroma cacao*) realizada por Balladares et al., (2016), foi relatado valor de pH de 3,58. Já em cultivo realizado para a produção de enzimas, a alta produção de pectinase foi com o pH inicial de 5,5 (THANGARATHAM E MANIMEGALAI, 2014), o que estaria em correspondência com os valores encontrados na caracterização de ambas as cascas. A importância do valor do pH encontrado é que sua concentração afeta o crescimento celular e a produção de metabólitos secundários (BALLADARES et al., 2016).

Como é possível observar nos dados da Tabela 5.1, a composição lignocelulósica não divergiu muito para as granulometrias analisadas. Segundo Daud et al. (2013), o teor de umidade pode depender do tempo de colheita, clima local e condições de armazenamento. Como as cascas de cacau foram armazenadas sob as mesmas condições e são da mesma origem, é esperado que haja concordância nos valores de umidade, ou seja, em torno de 5%.

A porção inorgânica de biomassas vegetais é analisada como cinza por incineração do material orgânico, sendo os principais componentes das cinzas da madeira: K, Ca e Mg, obtidos na incineração na forma de óxidos (KLOCK E ANDRADE, 2013). Um teor de cinzas de 4,0% foi relatado por Redgwella et al. (2003), enquanto que um teor de 12,3% foi relatado por DAUD et al. (2013) também para cascas de cacau. Os percentuais de extraíveis apresentaram-se bastante semelhantes em ambas as granulometrias de cascas, em torno de 17 e 18%.

A lignina possui composição e estrutura complexas além de ser um componente fenólico natural de alto peso molecular (LIU; LUO E ZHENG, 2018). Os resultados para os percentuais de lignina indicam que a granulometria entre 1,18 e 2,00 mm apresentou 41,28%, enquanto que as cascas <0,84 mm apresentaram 38,79% de lignina total. Em caracterização realizada por Chung et al. (2003) foi relatado um teor de lignina de Klason de 320 (g/Kg) em casca de cacau.

Hemiceluloses, juntamente com a celulose, são os principais polissacarídeos na parede celular vegetal. É possível observar que os percentuais de hemicelulose são similares para ambas as granulometrias, ou seja, em torno de 9%. Um percentual de 20% de hemicelulose foi relatado em casca de cacau por REDGWELLA et al. (2003).

As cascas de cacau com granulometria entre 1,18 a 2,00 mm apresentaram um teor de celulose um pouco maior do que as cascas < 0,84 mm, ou seja, teores de 22,29% (1,18 a 2,00 mm) e 18,83% (< 0,84 mm). Para Daud et al. (2013) os valores foram de 35,4% de celulose em cascas de cacau. Por constituir a base estrutural da parede celular de plantas, a celulose pode ser considerada substância natural de suma importância na natureza (KLOCK E ANDRADE, 2013).

A composição da casca de cacau (*Theobroma cacao*) variedade Forastero, em íons solúveis para correspondente às diferentes granulometrias está apresentada na Tabela 5.2.

TABELA 5.2 – COMPOSIÇÃO DE CASCAS DE CACAU EM ÍONS SOLÚVEIS

Íons solúveis (mg/g)	Granulometria (mm)	
	1,18 - 2,0	< 0,84
F ⁻	-	-
Cl ⁻	0,66 ± 0,06	0,46 ± 0,05
Br ⁻	-	-
NO ₃ ⁻	-	4,13 ± 2,48
PO ₄ ³⁻	2,29 ± 0,03	3,01 ± 0,10
SO ₄ ²⁻	9,99 ± 0,03	10,86 ± 0,09
Na ⁺	2,03 ± 0,64	0,94 ± 0,13
NH ₄ ⁺	0,69 ± 0,49	-
K ⁺	25,69 ± 0,20	28,76 ± 0,27
Mg ²⁺	2,17 ± 0,36	1,97 ± 0,08
Ca ²⁺	1,08 ± 0,51	0,67 ± 0,03

FONTE: O autor (2018).

A partir dos dados apresentados na Tabela 5.2, é possível observar que alguns íons não foram identificados na caracterização da granulometria entre 1,18 a

2,00 mm: F^- , Br^- , NO_3^- . Assim como os íons F^- , Br^- , NH_4^+ não foram detectados nas cascas de granulometria $<0,84$ mm. Ambas as granulometrias apresentaram uma elevada concentração de K^+ , acima de 25 mg/g, dentre os componentes analisados. Baixas concentrações de Cl^- foram igualmente observadas para ambas as cascas (abaixo de 0,67 mg/g). Alguns valores podem ser citados por Chung et al. (2003) para casca de cacau em (g/kg): K^+ , 17060; Na^+ , 160; Mg^{2+} , 4835.

A importância de se conhecer a composição de íons solúveis nas cascas de cacau está na possibilidade de melhor formular meios nutritivos para o crescimento de microrganismos e, conseqüente, produção de biomoléculas de interesse, sem a necessidade de se adicionar componentes que venham a elevar os custos do processo.

A pesar do paralelo com alguns estudos acerca da caracterização de cascas do cacau, é interessante frisar que ainda há ausência de informações sobre a composição lignocelulósica do cacau. O entendimento da composição das cascas de cacau é de grande importância para o conhecimento da matéria-prima que pode ser utilizada como substrato, uma vez que tratando-se de um resíduo ou subproduto, sua constituição é complexa.

5.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINASES

A seleção inicial de cepas com potencial para produção de pectinases foi realizada em meio sintético (REGINATTO et al., 2017), o qual continha 2% (m/v) de pectina (Sigma). Com o meio de produção utilizado e nas condições de fermentação de 28°C durante 120 h de cultivo em pH 4,0, todas as cepas testadas apresentaram atividade enzimática de pectinases, em termos de poligalacturonase (PG). Os resultados para a atividade enzimática estão apresentados na Tabela 5.3.

TABELA 5.3 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR DIFERENTES CEPAS DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO

Microrganismo	Atividade (U/mL)	pH
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 599	14,48 ± 1,89	3,35 ± 0,07
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 593	12,24 ± 3,09	4,17 ± 0,05
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 511	7,59 ± 0,43	2,39 ± 0,01
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	18,05 ± 3,12	2,74 ± 0,10
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3312	7,49 ± 1,37	2,57 ± 0,02
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2001	19,47 ± 2,61	3,25 ± 0,14
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2270	27,75 ± 2,16	3,44 ± 0,39
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 1278	3,95 ± 0,13	2,64 ± 0,01
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 334	14, 63 ± 1,86	5,23 ± 0,88
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 328	16,74 ± 1,59	3,11 ± 0,02
<i>Aspergillus niger</i> CCT 7716	11,49 ± 3,21	2,78 ± 0,34

FONTE: O autor (2018).

É possível observar que as cepas apresentaram atividades enzimáticas, desde $3,95 \pm 0,13$ U/mL para o *Aspergillus niger* NRRL 1278 até $27,75 \pm 2,16$ U/mL para o *Aspergillus niger* NRRL 2270. Isto mostra que apesar do meio de cultivo se mostrar eficiente para a produção de pectinases, cada cepa se comporta de modo diferente às condições de cultivo realizadas. Uma vez que todas as cepas apresentaram atividade PG, torna-se concordante com a literatura a grande utilização de microrganismos *Aspergillus* na produção de enzimas pectinases (NINGA et al., 2018; REBELLO et al., 2017; REGINATTO et al., 2017).

Além dos diferentes valores de atividade enzimática PG observados, também foram observadas diferenças nos valores de pH para cada cepa. Os pHs apresentados correspondem aos valores registrados ao final de cada cultivo. O pH do meio ao início do cultivo foi ajustado em 4,0, entretanto, os resultados apresentam variação entre $2,39 \pm 0,01$ para o *Aspergillus niger* NRRL 511 e $5,23 \pm 0,88$ para o *Aspergillus niger* NRRL 334.

Buscando conhecer o comportamento das cepas estudadas, frente à utilização das cascas de cacau como substrato para a produção de pectinases, foram selecionadas, dentre as cepas iniciais, 5 cepas. A produção de pectinases nesta etapa para cada cepa é apresentada na Tabela 5.4.

TABELA 5.4 - PRODUÇÃO DE PECTINASES UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO COM CASCAS DE CACAU PARA AS DIFERENTES CEPAS DE *Aspergillus niger*

Microrganismo	Atividade (U/mL)	pH
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	9,89 ± 0,45	3,76 ± 0,14
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2001	7,75 ± 2,90	3,59 ± 0,03
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2270	10,19 ± 0,59	3,20 ± 0,14
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 328	6,36 ± 2,25	4,74 ± 0,29
<i>Aspergillus niger</i> CCT 7716	10,89 ± 0,99	4,03 ± 0,12

FONTE: O autor (2018).

A cepa *Aspergillus niger* CCT 7716 apresentou atividade enzimática de 10,89 ± 0,99 U/mL e *Aspergillus niger* NRRL 2270 atividade de pectinases 10,19 ± 0,59 U/mL, sendo bem semelhantes para ambas as cepas. Enquanto que as cepas *Aspergillus niger* LPB 28 e *Aspergillus niger* NRRL 2001 apresentaram menores atividades de PG (6,36 ± 2,25 U/mL e 7,75 ± 2,90 U/mL, respectivamente). A cepa *Aspergillus niger* NRRL 3 produziu 9,89 ± 0,45 U/mL.

Diferentes valores de pH também foram observados ao final de cada fermentação, entretanto, apresentando-se mais próximos ao pH do meio ao início dos cultivos.

É possível observar uma diminuição dos valores em relação às atividades enzimáticas obtidas na etapa de seleção com meio sintético e uso de pectina (Sigma). Entretanto, é importante notar que o meio sintético era composto de pectina comercial onde os microrganismos dispunham de uma fonte de pectina pura. Na etapa seguinte, a fonte de pectina era a casca de cacau, um subproduto do processamento do cacau com uma composição complexa (DAUT et al., 2013). Ademais, a utilização da casca como meio nutriente, representa economia frente ao uso de pectina comercial cujos valores são bem elevados. Apesar dessa complexidade de composição, os microrganismos produziram enzimas que permitiram o consumo dos componentes da biomassa vegetal (KOWALCZYK et al., 2017).

Reginato e colaboradores (2017) produziram 14,0 U/mL utilizando meio de cultivo sintético e cepa *Aspergillus niger*. Já Barman et al. (2014) produziram 6,6 U/mL também com *Aspergillus niger* como microrganismo produtor.

A cepa *Aspergillus niger* NRRL 2270 foi então selecionada para os estudos de otimização da composição do meio de produção para melhor produção de pectinases.

5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA PRODUÇÃO DE PECTINASES

5.3.1 Etapa 1 – Seleção de componentes do meio de produção de pectinases - Planejamento Plackett & Burnman

Para testar o efeito de fatores individualmente sobre a atividade enzimática, foi realizado um planejamento experimental do tipo Plackett & Burnman com sete fatores e oito ensaios em dois níveis e três repetições do ponto central. Os fatores testados foram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, os quais correspondem a alguns componentes do meio de cultivo adotado como controle, acrescido de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Particularmente este planejamento é indicado quando os fatores avaliados são muitos e, deseja-se conhecer quais fatores realmente tem significância para o processo, tratando então de uma etapa de seleção. Atividades de pectinases obtidas podem ser observadas na Tabela 5.5.

TABELA 5.5 - SELEÇÃO DE FATORES PARA COMPOR MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES PLANEJAMENTO PLACKETT & BURMAN COM SETE FATORES, E OITO ENSAIOS TRÊS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

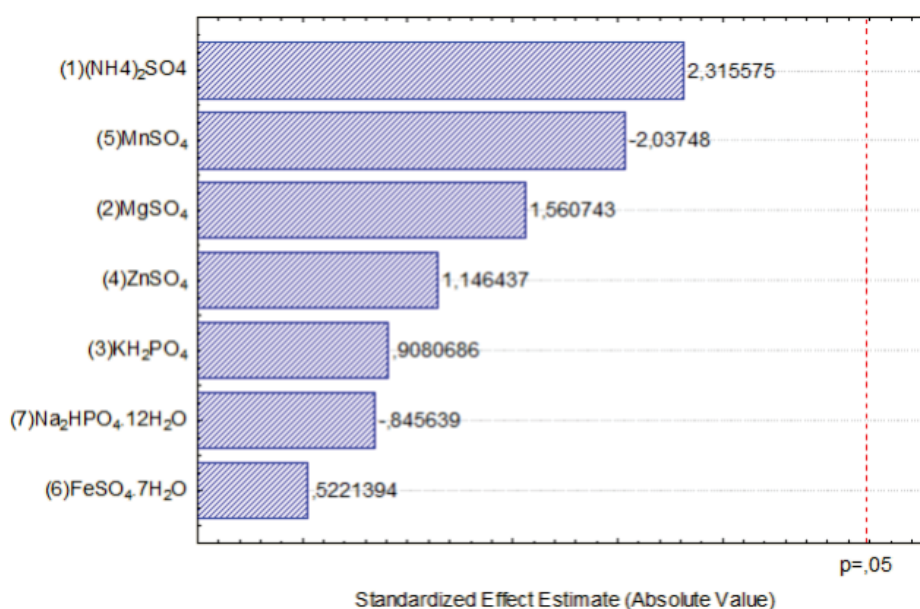
Ensaio	Fatores (g/L)								Atividade enzimática (U/mL)	Atividade enzimática (U/g)
	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	ZnSO ₄	MnSO ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O			
1	0	0	0	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	6,3x10 ⁻⁴	0	0	10,15 ± 0,02	203,00 ± 0,02
2	5	0	0	0	0	6,3x10 ⁻⁴	1	1	13,58 ± 0,01	271,62 ± 0,01
3	0	0,05	0	0	1,0x10 ⁻⁵	0	1	1	8,76 ± 0,01	175,29 ± 0,01
4	5	0,05	0	6,2x10 ⁻⁴	0	0	0	0	17,99 ± 0,02	359,71 ± 0,02
5	0	0	2,5	6,2x10 ⁻⁴	0	0	1	1	12,44 ± 0,01	248,86 ± 0,01
6	5	0	2,5	0	1,0x10 ⁻⁵	0	0	0	12,41 ± 0,01	248,20 ± 0,01
7	0	0,05	2,5	0	0	6,3x10 ⁻⁴	0	0	15,03 ± 0,02	300,65 ± 0,02
8	5	0,05	2,5	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	6,3x10 ⁻⁴	1	1	15,87 ± 0,03	317,48 ± 0,03
9 (C)	2,5	0,025	1,25	3,1x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁶	3,15x10 ⁻⁴	2,5	2,5	15,49 ± 0,02	309,89 ± 0,02

10 (C)	2,5	0,025	1,25	$3,1 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$3,15 \times 10^{-4}$	2,5	$16,04 \pm 0,02$	$320,78 \pm 0,02$
11 (C)	2,5	0,025	1,25	$3,1 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$3,15 \times 10^{-4}$	2,5	$15,48 \pm 0,02$	$309,56 \pm 0,02$

FONTE: O autor (2018).

É possível perceber que o ensaio 3 apresentou a menor atividade enzimática (175,29 U/g), enquanto a maior atividade de pectinases foi registrada no ensaio 4 (359,71 U/g). Neste ensaio, os componentes presentes eram MgSO_4 e ZnSO_4 . Os resultados para o ponto central mostram valores bem próximos entre si, indicando que o experimento apresentou muito boa reprodutibilidade experimental. Na Figura 5.1 é apresentado o gráfico de Pareto para o planejamento experimento Plackett & Burnman.

FIGURA 5.1 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTO PLACKETT & BURNMAN



A partir do gráfico de Pareto gerado com uso do software Statistica® 7.0 (Statsoft, USA), a ANOVA mostrou que os efeitos das variáveis independentes avaliadas não foram significativos com valor de $p < 0,05$. O coeficiente de determinação para esta análise foi de R^2 igual a 0,8340. Apesar das variáveis independentes não apresentarem um efeito significativo em nível de significância de 95 %, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi o mais representativo na resposta atividade enzimática. O NH_4^+ é o íon utilizado mais facilmente entre as formas inorgânicas de nitrogênio uma vez que não necessita de reações de oxi-redução, pois o (N) está no mesmo grau de oxidação que o (N) presente em moléculas biológicas (GALVAGNO E FORCHIASSIN, 2010).

5.3.2 Etapa 2 - Seleção da fonte de nitrogênio

Com o objetivo de selecionar a melhor fonte de nitrogênio para a produção de pectinases com cascas de cacau, realizou-se um teste variando a fonte de nitrogênio sendo os resultados mostrados na Tabela 5.6. Para a realização dos experimentos, buscou-se manter o equivalente em nitrogênio para as fontes testadas em relação ao meio de cultivo controle, conforme tabela abaixo.

TABELA 5.6 - SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Fonte de Nitrogênio	Concentração (g/L)	Atividade enzimática (U/g)	pH
1*	Extrato de levedura + (NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 5	327,49 ± 1,61	3,05 ± 0,04
2	Extrato de levedura	10,55	419,42 ± 3,01	3,77 ± 0,04
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,02	213,34 ± 0,82	3,28 ± 0,09
4	(NH ₂) ₂ CO	2,26	308,68 ± 2,63	5,38 ± 0,05
5	NH ₄ Cl	4,03	211,80 ± 0,72	3,18 ± 0,03
6	(NH ₂) ₂ CO + (NH ₄) ₂ SO ₄	1,12 2,47	215,32 ± 1,90	3,50 ± 0,05

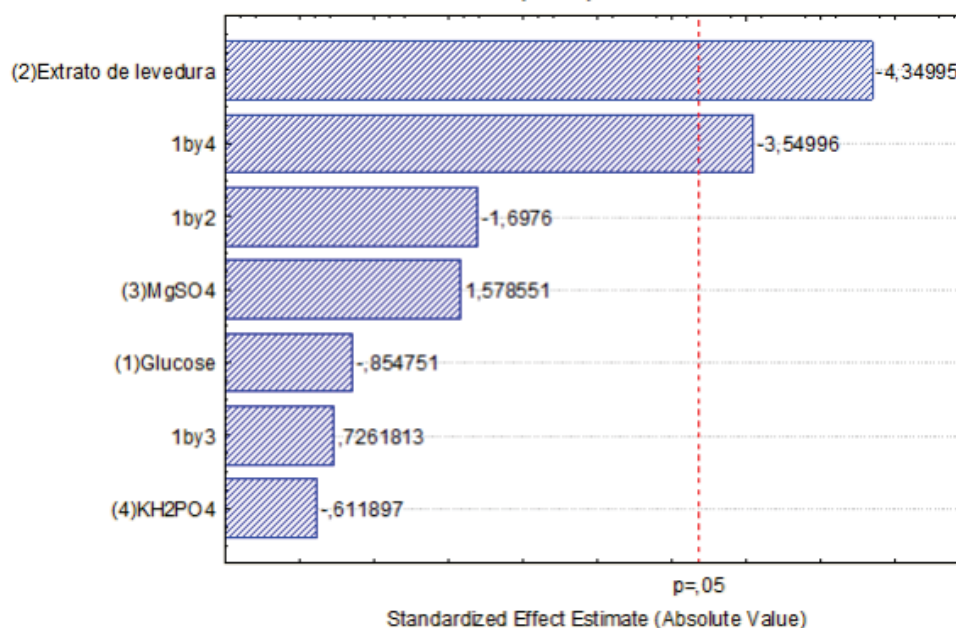
* Meio de cultivo controle. FONTE: O autor (2018).

Os resultados indicam uma maior atividade de pectinases no ensaio 2, com uma atividade de 419,42 (U/g) e com uso de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A segunda maior atividade enzimática registrada corresponde ao meio de cultivo controle. Neste meio as fontes de nitrogênio consistiam em Extrato de levedura e (NH₄)₂SO₄. A ANOVA mostrou que os ensaios avaliados apresentaram uma diferença significativa com valor de $p < 0,05$ a um p valor de 0,0009. A fonte de nitrogênio escolhida para os estudos posteriores foi o extrato de levedura.

5.3.3 Etapa 3 – Estudos das concentrações de variáveis significativas para a produção de pectinases - Planejamento fatorial incompleto 2⁽⁴⁻¹⁾

O planejamento experimental foi realizado com quatro fatores, adicionados ao meio à base de casca de cacau, em diferentes concentrações, sendo eles: Glicose, Extrato de levedura, MgSO₄ e KH₂PO₄. Na Figura 5.2 encontra-se o gráfico de Pareto obtido para este planejamento. Os níveis dos fatores estudados, quando combinados resultaram em relação Carbono/Nitrogênio de 10:1; 15:1 e 20:1, conforme descrito em metodologia.

FIGURA 5.2 - DIAGRAMA DE PARETO REFERENTE AO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DE PECTINASES - PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO 2⁽⁴⁻¹⁾



No diagrama de Pareto vê-se que a variável independente concentração de extrato de levedura foi significativa em nível de 95% de confiança, tendo efeito negativo. Tal fato indica que baixas concentrações de extrato de levedura poderão apresentar aumento na resposta atividade enzimática. Ainda, é notado que a interação entre as avariáveis concentração de extrato de levedura e concentração de KH₂PO₄ foi significada, mas com efeito negativo, o que também

pode ser uma indicação de aumento da resposta (atividade de pectinases) com o abaixamento das concentrações destas variáveis.

Na Tabela 5.7 é mostrado os valores das atividades enzimáticas obtidas para o planejamento fatorial incompleto $2^{(4-1)}$. Os resultados obtidos indicam que os ensaios 1, 3, e os do ponto central apresentaram atividades enzimáticas bem próximas, além de indicarem reprodutibilidade dos experimentos, se considerado o ponto central. Os ensaios 2 e 7 também apresentaram atividades bastante próximas. O ensaio 8 apresentou a menor atividade enzimática, neste as concentrações para todas as variáveis foram máximas, indicando inibição na produção da pectinase. Entretanto, no ensaio 6 foi registrada a maior atividade enzimática dentro do planejamento. Este foi realizado nas concentrações máximas de glicose e $MgSO_4$ e mínima de extrato de levedura e KH_2PO_4 .

TABELA 5.7 - ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE VARÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES - PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(4-1)}$

Ensaio	Fatores (g/L)				Atividade enzimática (U/g)
	Glicose	Extrato de levedura	$MgSO_4$	KH_2PO_4	
1	5	3	0,5	2,5	200,69 ± 0,05
2	15	3	0,5	4,5	190,13 ± 0,01
3	5	3,6	0,5	4,5	206,63 ± 0,01
4	15	3,6	0,5	2,5	150,54 ± 0,02
5	5	3	1,5	4,5	280,20 ± 0,01
6	15	3	1,5	2,5	326,06 ± 0,01
7	5	3,6	1,5	2,5	162,75 ± 0,01
8	15	3,6	1,5	4,5	111,61 ± 0,02
9 (C)	10	3,33	1	3,5	212,24 ± 0,01
10 (C)	10	3,33	1	3,5	232,36 ± 0,01
11 (C)	10	3,33	1	3,5	252,82 ± 0,03

FONTE: O autor (2018).

A ANOVA mostrou que os efeitos da variável independente concentração de extrato de levedura e a interação entre as variáveis concentração de extrato de levedura e concentração de KH_2PO_4 foram significativos (p valor $<0,05$), com coeficiente de determinação para esta análise de R^2 igual a 0,9278.

Segundo Galvagno e Forchiassin (2010), um meio balanceado deve conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio no favorecimento da produção de enzimas, relação maior poderá levar a altas concentrações proteicas. Em estudo realizado para produção de pectinase por fermentação de bagaço de laranja, Mahmoodi et al (2017), indicaram que a relação C/N de 10 foi a melhor para a obtenção de pectinases.

5.3.4 Etapa 4 - Testes complementares para a otimização do meio de produção de pectinases

Foram realizados ensaios complementares aos planejamentos experimentais realizados, tendo como objetivo avaliar o efeito de diferentes composições do meio de produção sobre a atividade enzimática. Os resultados para este teste estão descritos na Tabela 5.8.

No ensaio 1, composto pelo meio de produção controle, o qual tem como base casca de cacau, a atividade encontrada foi de 304,17 U/g. O uso de extrato de pectina em solução (Ensaio 5) foi positivo, pois propiciou uma produção de 468,69 \pm 2,0 U/g, que corresponde a uma atividade 1,6 vezes maior. A pectina nesse caso, estaria mais disponível para consumo pelo fungo. Os ensaios 2 e 4, os quais foram realizados sem a presença de glicose, indicaram valores de atividade enzimática bem próximos, entretanto, levando-se em consideração que o ensaio 4 foi realizado com a adição de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ como fonte de nitrogênio suplementar, observou-se uma atividade um pouco menor (255,57 U/g) do que no ensaio 2 (272,5 U/g), no qual havia somente extrato de levedura. Tal diminuição da atividade enzimática se deve, provavelmente, ao fato de a relação C/N ser menor, o que pode não ter favorecido a produção da enzima. A menor atividade de pectinase foi identificada no ensaio 3, onde havia uma alta

concentração de extrato de levedura, mostrando que grandes concentrações de nitrogênio, ou seja, menores relações C/N, não são favoráveis à produção da enzima. Por fim, o ensaio 6, o qual foi preparado apenas com a casca de cacau indicou atividade enzimática maior que as encontradas nos ensaios 1, 2, 3 e 4, indicando que a casca de cacau sem a presença dos demais componentes apresenta potencial para a produção da pectinase, o que se justifica pela presença nas cascas de cacau de compostos (muitos identificados na caracterização) que auxiliam na nutrição e produção microbiana do metabólito de interesse.

TABELA 5.8 - ENSAIOS COMPLEMENTARES PARA A OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE PECTINASES

Ensaio	Componentes do meio de cultivo (g/L)											Atividade (U/g)
	Casca cacau	Glicose	Extrato levedura	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	FeSO ₄	ZnSO ₄	MnSO ₄	(NH ₂) ₂ CO		
1*	50	5	0,05	5	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0	304,17 ± 1,57	
2	50	0	0,05	5	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0	272,5 ± 2,10	
3	50	0	10,55	0	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0	186,61 ± 0,47	
4	50	0	0	0	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	2,26	255,57 ± 2,56	
5**	50	0	0,05	5	0,5	2,5	6,3x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	0	468,69 ± 2,0	
6	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	333,65 ± 0,78	

* Meio controle

** Meio preparado à base de extrato de pectina + cascas de cacau

FONTE: O autor (2018).

5.3.5 Etapa 5 - Planejamento fatorial fracionado $3^{(3-1)}$

Buscando dar continuidade à seleção de componentes do meio de produção de pectinases, realizou-se um planejamento experimental fatorial incompleto $3^{(3-1)}$ com 3 fatores: concentração de cascas de cacau, extrato de levedura e extrato de pectina. Abaixo, na Tabela 5.9 é mostrado os valores de atividades enzimáticas obtidas no planejamento experimental fatorial incompleto $3^{(3-1)}$ e na Figura 5.3 é mostrado o diagrama de Pareto.

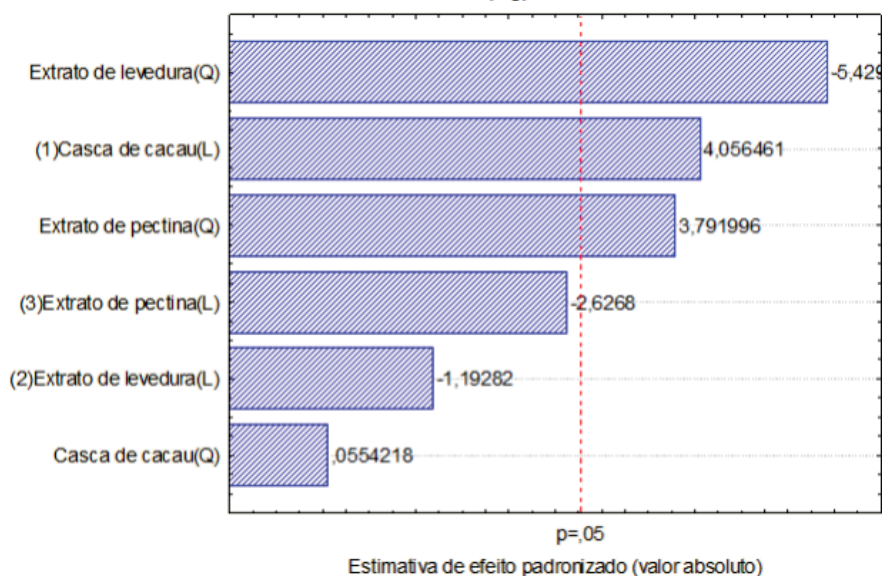
TABELA 5.9 - ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE VARÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES - PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $3^{(3-1)}$

Ensaio	Fatores (g/L)			Atividade (U/g)
	Casca de cacau	Extrato de levedura	Extrato de pectina	
1	25	0	0	233,68 ± 0,02
2	25	0,05	75	138,99 ± 0,02
3	25	0,1	50	252,49 ± 0,3
4	50	0	75	236,65 ± 0,1
5	50	0,05	50	232,03 ± 0,02
6	50	0,1	0	267,33 ± 0,02
7	75	0	50	341,63 ± 0,02
8	75	0,05	0	232,69 ± 0,1
9	75	0,1	75	237,31 ± 0,03
10 (C)	50	0,05	50	199,70 ± 0,1
11 (C)	50	0,05	50	238,63 ± 0,1

FONTE: O autor (2018).

É possível perceber que a maior atividade enzimática ocorreu no ensaio 7, com a maior concentração de casca de cacau e extrato de pectina na concentração de 50 g/L. enquanto que a menor atividade enzimática foi observada no ensaio 2, o qual consistiu nas maiores concentrações de casca de cacau e extrato de pectina. Para avaliar o efeito destas variáveis e estudar as melhores concentrações, estudos posteriores foram realizados.

FIGURA 5.3 - DIAGRAMA DE PARETO PARA PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO $3^{(3-1)}$ COM OS FATORES INDEPENDENTES CASCA DE CACAU, EXTRATO DE LEVEDURA E EXTRATO DE PECTINA



A ANOVA mostrou que os efeitos das variáveis independentes avaliadas foram significativos com valor de $p < 0,05$. O coeficiente de determinação para esta análise foi de R^2 igual a 0,9392. A variável com maior efeito significativo foi o extrato de levedura, que de acordo com o diagrama de Pareto, seu uso em baixas concentrações tende a aumentar a resposta em termos de atividade enzimática, o que mais uma vez sugere que maiores relações C/N são favoráveis à síntese enzimática. Os efeitos de interação entre as variáveis estudadas não foram significativos. Diante dessa situação, decidiu-se realizar nova etapa de otimização, agora para a determinação da melhor concentração para a casca de cacau e extrato de pectina.

5.3.6 Etapa 6 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para estudo do efeito da concentração de casca de cacau e extrato de pectina

Realizou-se ainda um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional DCCR para investigação da influência dos fatores: concentração de casca de cacau e concentração de extrato de pectina sobre a

produção de pectinases. Fixou-se a concentração de extrato de levedura em 0,05 g/L, a mesma utilizada no meio de produção controle, já que nos testes anteriores seu efeito não foi significativo. Na Tabela 5.10 encontram-se as atividades enzimáticas para o planejamento DCCR e na Figura 5.4 está o diagrama de Pareto.

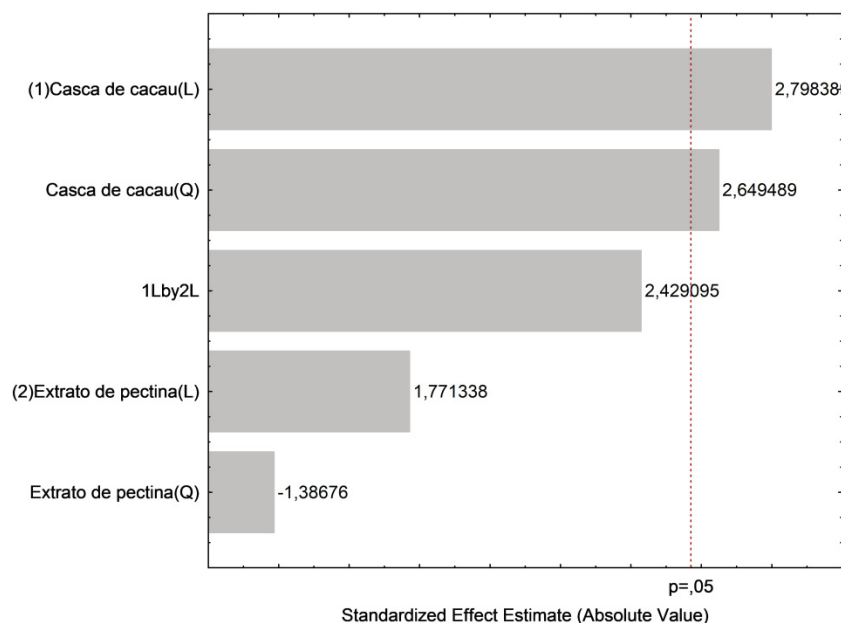
TABELA 5.10 - ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE VARÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES - PLANEJAMENTO DCCR

Ensaio	Fatores (g/L)		Atividade enzimática (U/g)
	Casca de cacau	Extrato de pectina	
1	50	40	307,54 ± 0,02
2	50	60	308,09 ± 0,02
3	100	40	293,79 ± 0,03
4	100	60	578,87 ± 0,01
5	39,75	50	456,00 ± 0,01
6	110,25	50	602,03 ± 0,01
7	75	36	327,33 ± 0,01
8	75	64	332,83 ± 0,02
9 (C)	75	50	354,28 ± 0,03
10 (C)	75	50	387,82 ± 0,03
11 (C)	75	50	366,92 ± 0,02

FONTE: O autor (2018).

A partir do planejamento DCCR, foi alcançada uma maior atividade enzimática no ensaio 6, o qual continha a maior concentração de casca de cacau (110,25 g/L) e a concentração média para extrato de pectina (50 g/L). O ensaio 3 apresentou a menor atividade enzimática, no qual continha a menor concentração para extrato de pectina. Portanto, uma maior produção enzimática pode ser alcançada com o aumento na concentração de casca de cacau.

FIGURA 5.4 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO DCCR PARA ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS FATORES CASCA DE CACAU E CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE PECTINA

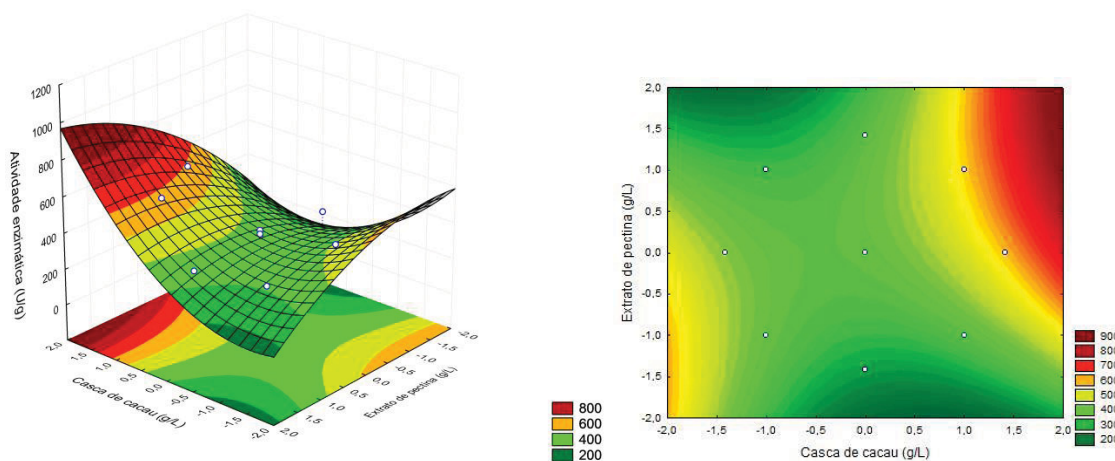


O digrama de Pareto indica que a variável independente concentração de casca de cacau teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a atividade de pectinase. Percebe-se ainda que as interações entre as variáveis estudadas não foram significativas.

Foi alcançada atividade enzimática de 602,03 U/g referente ao ensaio 6, com 110,25 (g/L) de casca de cacau, extrato de pectina a 5% (m/v) e 0,05 (g/L) de extrato de levedura, sendo, portanto, estabelecida com condição otimizada para a produção de pectinases. Levando-se em consideração a atividade enzimática obtida no início dos ensaios experimentais, de 220 U/g, pode-se considerar que houve um aumento de 176% na atividade enzimática dentro das condições avaliadas.

Na Figura 5.5 é apresentada superfície de resposta para o planejamento DCCR onde é possível visualizar o perfil da atividade enzimática em função das variáveis independentes concentração de casca de cacau e concentração de extrato de pectina.

FIGURA 5.5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O PLANEJAMENTO DCCR COM OS FATORES INDEPENDENTES CONCENTRAÇÃO DE CASCA DE CACAU E CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE PECTINA



Os gráficos de superfície de resposta ilustram uma tendência de aumento da atividade enzimática relacionada aos aumentos de concentração de cascas de cacau. Entretanto, concentrações muito elevadas de cascas de cacau teriam como consequência o aumento de viscosidade no meio, limitando assim operacionalmente os processos de produção em biorreatores.

A ANOVA (Tabela 5.11) mostrou que o efeito da variável concentração de casca de cacau foi significativo para p valor $<0,05$. O coeficiente de determinação para esta análise foi de R^2 igual a 0,8530.

TABELA 5.11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) - PLANEJAMENTO DCCR PARA ESTUDO DO EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE CASCA DE CACAU E EXTRATO DE PECTINA SOBRE ATIVIDADE DE PECTINASE

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
(1)Casca cacau(L)	26861,4	1	26861,43	7,830980	0,038066
Casca cacau(Q)	24078,9	1	24078,94	7,019793	0,045454
(2)Extrato pectina(L)	10762,6	1	10762,57	3,137638	0,136712

Extrato					
pectina(Q)	6596,5	1	6596,53	1,923103	0,224161
1e2	20239,6	1	20239,61	5,900504	0,059447
Erro	17150,7	5	3430,15		
Total	116702,8	10			

FONTE: O autor (2018).

Determinou-se, ainda, o modelo que descreve o comportamento da resposta atividade enzimática em função das variáveis concentração de casca de cacau e concentração de extrato de pectina, Equação 5.1

$$Z = 369,68 + 57,94*x + 65,31*x^2 + 36,68*y - 34,18*y^2 + 71,13*x*y \quad (5.1)$$

Onde: Z = Atividade de pectinase (U/g)

X = Concentração de caca de cacau (g/L)

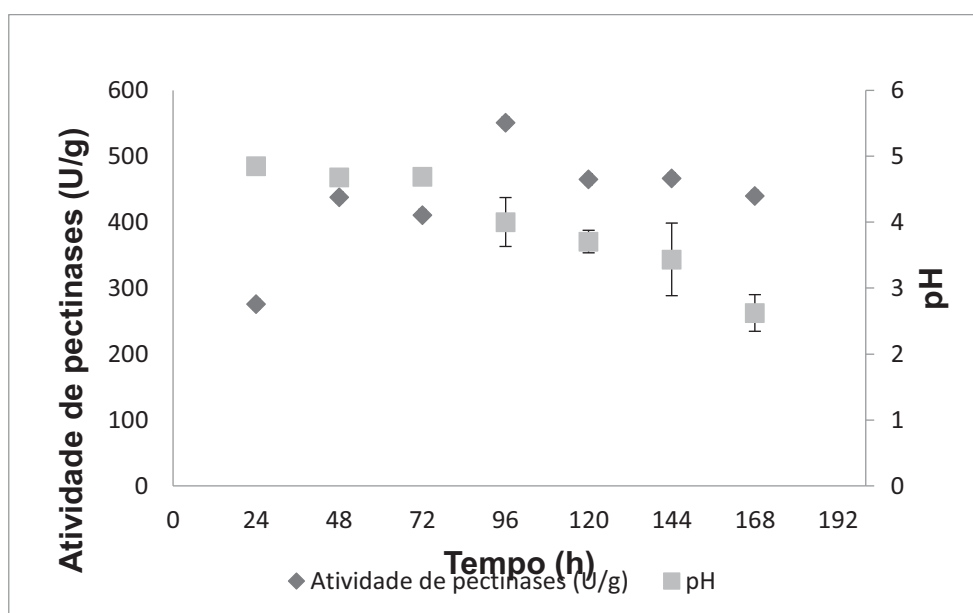
Y = Concentração de extrato de pectina (g/L)

O planejamento experimental do tipo DCCR é um método que foi anteriormente usado para otimizar parâmetros como, pH, temperatura e concentração de substrato, com aplicação em processo de produção de pectinase produzida por *A. niger* (AJAYI et al., 2018). Em estudo para produção de pectinases por *A. niger*, realizado por Sandri e Silveira (2018), estes obtiveram produção máxima de 68 U/g. Em fermentação no estado sólido (FES) para produção e otimização de poligalacturonase a partir de casca de manga, usando o fungo filamentoso *Fusarium moniliforme*, Kumar et al (2010), em condições otimizadas, alcançaram atividade de 43,2 U/g. De acordo com Fernández (2009), nas melhores condições para fermentação de meio sólido à base de polpa cítrica para de pectinases, foi obtido atividade enzimática de 250 U/g. Entretanto, valores mais elevados também são observados para a produção de pectinases. Em produção por fermentação em estado sólido, com meio contendo farelo de trigo, Phutela et al (2005), alcançou atividade para pectinase de 1116 U/g.

5.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PECTINASES UTILIZANDO CASCA DE CACAU COMO SUBSTRATO

Buscando observar o perfil de produção das pectinases, foi realizado estudo cinético, nas condições do meio de produção otimizado. Na Figura 5.6 é apresentada a cinética de produção de pectinases.

FIGURA 5.6 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PECTINASE UTILIZANDO CASCA DE CACAU EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS



A partir dos dados de cinética, pode-se observar que a máxima de atividade de pectinases foi alcançada em 96 h de cultivo, atingindo 551,30 U/g, esse valor corresponde a 27,57 U/mL, indicando que já ao quarto dia o processo poderá ser interrompido. No tempo restante de cultivo, a atividade permaneceu praticamente constante, mantendo-se ao final de 168 h em 440,00 U/g. A máxima produtividade foi de 5,74 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Em trabalho realizado por Biz (2012), a maior atividade de pectinases por *A. niger* e utilizando bagaço de laranja como substrato em fermentação no estado sólido, foi 77 U/g em 19 h de produção, o que corresponde à produtividade de 4,0 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Em trabalho

realizado por Fernández (2009), para a produção de pectinase por fermentação em meio sólido à base de polpa cítrica, foi encontrado um valor máximo de produtividade de 3,5 (U.g⁻¹.h⁻¹).

A partir de *Aspergillus* sp. em cultivo submerso em meio contendo bagaço de laranja ou pectina cítrica como única fonte de carbono, atingiu-se atividade de 3,6 U/mL após 48h (CAMARGO et al., 2005), enquanto que a produção em resíduos de casca de laranja em fermentação submersa por cepa de *A. niger* chegou a 77,2 U/mL após 5 dias (AHMED et al., 2016). Apesar dos diferentes valores de produção de pectinases ao longo do tempo de cultivo, é importante considerar que a produção depende do microrganismo, tipo de fermentação e concentração de nutrientes no meio de cultivo (JOSHI; PARMAR E RANA, 2006).

Observa-se ainda que os valores de pH tendem a diminuir ao longo do processo de fermentação, chegando em 4,85 após 24 h de cultivo e atingindo 2,62 no tempo final de fermentação de 168 h. Essa diminuição possivelmente está associada à produção de metabólitos como ácidos orgânicos pelo microrganismo nas condições de cultivo.

5.5 SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PECTINASE

5.5.1 Precipitação de pectinase produzida a partir de casca de cacau com sulfato de amônio

Dessa forma, o processo de precipitação por sulfato de amônio como agente precipitante foi realizado nas amostras do extrato enzimático obtido logo após processo fermentativo em meio otimizado. Os parâmetros obtidos para a precipitação da enzima estão descritos na Tabela 5.12.

TABELA 5.12 - PARÂMETROS PARA A PRECIPITAÇÃO DE PECTINASE COM SULFATO DE AMÔNIO

Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Total (U)	Rendimento atividade (%)	Proteína total (mg)	Rendimento proteínas (%)
Extrato bruto	15,98	0,128	125,10	11186,85	100,00	89,422	100,00
Sobrenadante	4,41	0,003	1470,0	3326,15	29,73	1,977	2,21
Precipitado	17,83	0,097	183,44	12480,13	111,56	68,034	76,08

FONTE: O autor (2018).

Após a realização de precipitação por sulfato de amônio com saturação de 80%, obteve-se menor atividade enzimática 4,41 U/mL na fração do sobrenadante do que a encontrada no extrato bruto no início da precipitação. Porém, na fração do precipitado o valor de atividade enzimática apresentou-se próximo ao do extrato bruto, sendo eles 17,83 U/mL para o precipitado e 15,98 U/mL no extrato bruto.

Os valores de rendimento em atividade (111,56%) indicam que a enzima encontra-se no precipitado, apresentando valor maior, quando comparado ao encontrado na fração do sobrenadante, com 29,73%, além de indicar que houve a concentração da pectinase após etapa de precipitação. Ainda com relação aos rendimentos, pode-se notar que o rendimento em proteína na fração do precipitado foi de 76,08, enquanto o encontrado no sobrenadante foi de 2,21%. Estes valores indicam que o processo de precipitação foi favorável, uma vez que os maiores rendimentos, tanto em proteína quanto em atividade enzimática encontram-se no precipitado. Isto indica que as enzimas pectinases foram precipitadas e concentradas em sua maioria.

Em trabalho realizado por Ezugwu et al. (2012), a concentração de proteínas no extrato enzimático bruto foi determinada como 1,372 mg/mL, com atividade específica de 11,20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Após a precipitação com sulfato de amônio a 80%, a atividade específica foi determinada como 11,78 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Enzima pectinase produzida em estudos por Ahmed et al. (2016), foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, onde a atividade específica foi de 23,6 U/mg.

Uma estratégia possível para precipitação foi descrita por Pedrolli (2008), o qual utilizou 70% de saturação com sulfato de amônio como primeira etapa de purificação de pectinase. Ainda, em trabalho realizado por Pedrolli e Carmona (2010), com precipitação com sulfato de amônio com saturação de 70%, foi obtida atividade específica de 60,4 U/mg, partindo de um extrato bruto com atividade específica de 14,19 U/mg, além de 4,0 mg em total de proteína e rendimento de 99,5%.

5.5.2 Processo de separação e purificação de pectinases por membranas

O sistema de separação por membranas MF e UF consiste na filtração sob fluxo tangencial da amostra que é bombeada por uma bomba peristáltica permitindo assim o fluxo através das membranas, resultando em uma fração retida e uma fração permeada (SILVA, 2017). A filtração acontece através de uma membrana que tem um ponto de corte de peso molecular seletivo, portanto, separará o extrato com base no tamanho das partículas, não na carga (DAKO et al., 2012).

O extrato bruto da produção de pectinase foi inicialmente microfiltrado em membrana com tamanho de poro de 0,2 μm , buscando-se com isso promover a remoção de partículas em suspensão e macromoléculas. São apresentados na Tabela 5.13 os resultados de cada etapa de microfiltração (MF) e de ultrafiltração (UF) do extrato enzimático contendo pectinases.

As principais características favoráveis a este sistema de purificação, compreendem a separação sem que ocorra mudança de fase, na maioria dos casos, além de especificidade e simplicidade operacional. Com relação às desvantagens da UF, tem-se o entupimento da membrana devido a partículas em suspensão formadas pela fermentação (NOBREGA; BORGES; HABERT, 2015; VIJAYARAGHAVAN; RAJ & VINCENT, 2016).

TABELA 5.13 - SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PECTINASES POR PROCESSO DE MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO POR MEMBRANAS

Membrana	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Total (U)	Rendimento Recuperação (%)	Fator Purificação
Extrato bruto	12,37	0,017	720,74	8043,173	100,00	1,00
MF - 0.2 µm Permeado	14,65	0,048	306,97	7324,722	91,07	0,43
MF - 0.2 µm Retido	14,05	0,190	73,80	1769,758	22,00	0,10
UF - 30 KDa Permeado	2,69	0,001	2310,98	774,699	10,58	3,21
UF - 30 KDa Retido	40,95	0,008	4852,50	8681,269	118,52	6,73

Membrana de microfiltração (MF); Membrana de ultrafiltração (UF). FONTE: O autor (2018).

Logo em seguida à MF, a fração permeada foi então submetida à UF em membrana de 30 kDa. Após a passagem e re-circulação da enzima através dessa membrana, até volume pré-estabelecido de retido, a enzima de interesse foi concentrada, o que pôde ser observado pelo aumento da atividade enzimática de pectinase ao final do processo de UF, indicando a concentração da enzima de interesse. O rendimento do processo foi bastante considerável na fração do retido da UF-30 kDa. Após a separação e recuperação por MF e UF a atividade enzimática obtida foi de 40,95 U/mL, considerando que o extrato enzimático purificado foi obtido pelo uso de cascas de cacau como substrato, temos a atividade também corresponde a 819 U/g. Já em relação à atividade enzimática alcançada ao final da otimização do meio de produção, o aumento obtido, após a separação por MF e UF, foi de 36%. Singh et al. (1999), utilizando membrana de 30 kDa para concentrar 100 L de extrato de pectinase, obtiveram um rendimento de recuperação após ultrafiltração de 91%. Após etapa de UF, Poletto et al (2015) obtiveram uma recuperação de 73,7%, utilizando membrana de 10 kDa. Ambos as pectinases obtidas por FES.

A literatura relata valores de massa molar para enzimas pectinases que variam, 60 a 64 kDa (TAKCI E TURKMEN, 2016), pectinase de *Aspergillus* purificada foi determinada como 41 e 43 kDa (Mahesh et al., 2016), outra pectinase produzida por Yu; Zhang e Gu (2017), tinha aproximadamente 65 kDa. Dessa forma, a utilização da UF de 30 kDa teve como propósito a retenção da enzima de interesse, considerando que a maioria das pectinases apresentam massa molecular acima de 30 kDa. Testes preliminares foram realizados com o intuito de se avaliar qual(is) membrana(s) poderiam ser utilizadas para esse processo, os quais demonstraram que as proteínas de interesse ficavam retidas na fração acima de 30 kDa. Daí a escolha da referida membrana para o presente processo.

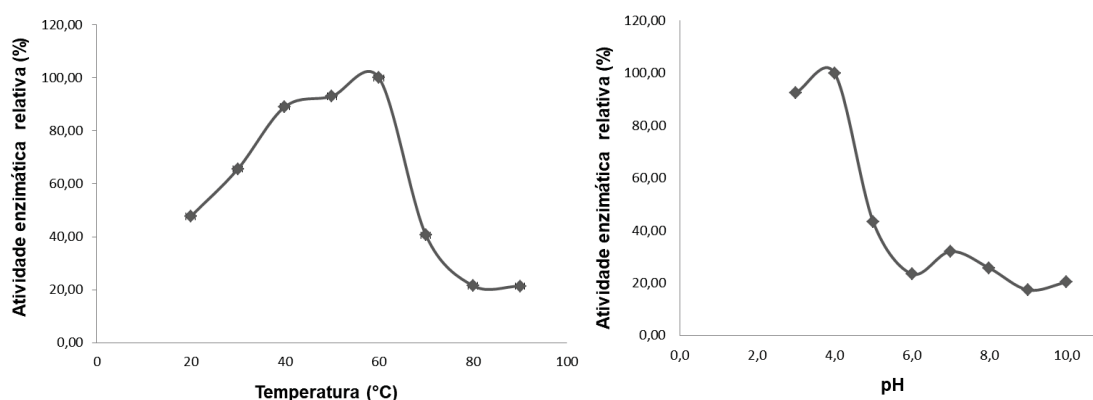
O sistema de MF e UF mostrou-se eficiente na separação, purificação e concentração de enzimas pectinases, apesar de eventuais entupimentos de membranas em decorrência da presença de partículas em suspensão e residual de pectina, provindas do extrato fermentado. A incrustação de membranas resulta de interações físicas e/ou químicas entre a membrana e vários componentes que estão presentes no fluxo do processo, por exemplo, proteínas que se acumulam na membrana (HARRISON, 2015).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASE

5.6.1 Determinação do perfil de temperatura e pH

Foi investigado o perfil de temperatura e pH ótimos da pectinase produzida. Os perfis de temperatura e pH são apresentados na Figura 5.7. Estes parâmetros são de total importância na condução de processos biotecnológicos.

FIGURA 5.7 - PERFIL DE TEMPERATURA E PH PARA A PECTINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger*



É possível identificar pelo perfil de temperatura que a partir 40°C a pectinase produzida apresentou razoável atividade enzimática, estando em torno de 90% de sua atividade. A atividade máxima foi atingida a 60°C, passando a diminuir, mas ainda apresentando atividade a 90°C. Portanto, a pectinase produzida apresenta atividade em um amplo espectro de temperatura, o que é bastante favorável em processos que são operados a temperaturas elevadas.

A mesma temperatura ótima de 60°C foi encontrada por Nadaroğlu et al (2010), para enzimas pectinolíticas produzidas por *Bacillus pumilus*. Entretanto, Rajendran et al (2011) relataram uma atividade máxima de pectinases produzida por *Fusarium sp.* na temperatura de 27°C. Para Suresh & Viruthagiri (2010), a temperatura ótima de pectinase de *Aspergillus niger* foi de 40°C. Pectinases de *A. niger* (laranja) demonstraram temperatura ótima de 40°C, enquanto a pectinase de *A. niger* (abacaxi) apresentou atividade a 55°C, de acordo com Ezugwu et al (2014). Portanto, as enzimas pectinases produzidas a partir de casca de cacau apresentam a vantagem

de um amplo espectro podendo atuar em diferentes temperaturas, o que as tornam de grande aplicabilidade em usos biotecnológicos.

A partir do perfil de pH, identificou-se que a pectinase produzida mostrou atividade enzimática bastante elevada em valores de pH ácido, atingindo um máximo de atividade em pH 4,0. Os valores de atividades foram bem menores à medida que o pH se alcalinizava.

Alguns valores de pH ótimo também são relatados na literatura, por exemplo, Suresh e Viruthagiri (2010) identificaram pH ótimo de 5,0 para pectinase de *Aspergillus niger*. Ezugwu et al (2014), também relatou pH ótimo 5,0 para pectinase de *A. niger*, enquanto que Buga; Ibrahim e Nok (2010), encontraram pH ótimo de 4,5 também para pectinase de *A. niger*. É possível perceber que apesar de variados pHs, as pectinases apresentam de modo geral atividade ótima em meios mais ácidos.

5.6.2 Teste do efeito da presença de íons e outras substâncias sobre atividade de pectinase

Os resultados obtidos após o teste do efeito da presença de íons e de outras substâncias sobre a atividade de pectinase são apresentados na Tabela 5.14.

TABELA 5.14 - EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS SOBRE ATIVIDADE DE PECTINASE

Substância	Atividade relativa (%)	
	5 mM	10 mM
EDTA	40,57	32,83
KCl	83,63	89,10
BaCl ₂	92,85	90,86
Citrato de sódio	85,38	77,40
CoCl ₂	90,62	70,82
ZnSO ₄	76,32	39,40
MgSO ₄	65,68	77,08
CaCl ₂	70,28	26,42
NaCl	85,06	84,61

NH ₄ Cl	58,84	81,08
MnSO ₄	86,81	83,65
FeSO ₄	75,05	61,21
Controle	100,00	100,00

FONTE: O autor (2018).

As concentrações testadas para cada substância foram 5 e 10 mM, seguida da metodologia de determinação da atividade enzimática em tampão citrato pH 4,0. Dentre as substâncias avaliadas, o EDTA inibiu consideravelmente a atividade da pectinase para menos da metade em ambas as concentrações. A inibição da atividade por EDTA, na concentração de 10 mM pode indicar uma dependência da enzima por cátions. Conforme Pedrolli (2008), o ZnSO₄ e CaCl₂ na concentração de 10 mM também inibiram significativamente a atividade da pectinase, a qual apresentou atividade relativa residual de apenas 39,40% e 26,42%, respectivamente. Os outros íons e substâncias testadas reduziram de forma não tão significativa, de 8 a 35%, a atividade enzimática. Nenhuma das substâncias avaliadas exerceu atividade indutora sobre a pectinase produzida. Segundo Nadaroğlu et al (2010), uma pectinase purificada foi completamente inibida por 10 mM de Mn²⁺ e EDTA, além de 10 mM de Zn²⁺, Cu²⁺ e Fe²⁺ causarem inibição.

5.6.3 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima pectinase

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática foi determinado pela incubação da enzima em diferentes concentrações de solução de pectina (Sigma) como substrato (0,05 a 1,5% (m/v)).

A partir deste estudo, foi possível obter dois parâmetros enzimáticos, V_{\max} e k_m – velocidade máxima e constante de Michaelis-Menten, respectivamente. Para tanto, foi realizada a linearização da curva velocidade de Michaelis-Menten obtida pelo método de Lineweaver-Burke. Para a linearização foi traçado o gráfico de $1/V$ em função de $1/S$, obtendo-se uma reta, na qual o coeficiente linear é igual a $1/V_{\max}$ e o coeficiente angular é igual a k_m/V_{\max} .

Abaixo, na Tabela 5.15 estão os resultados referentes ao k_m e V_{max} obtidos para a pectinase, bem como os parâmetros de energia de ativação (E_a) e energia da reação de desativação (E_d).

TABELA 5.15 - PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS PARA PECTINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* A PARTIR DE CASCA DE CACAU

Parâmetro cinético	Valores encontrados
K_m (mg/mL)	3,31
V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	22,47
E_a (KJ/mol)	15,05
E_d (KJ/mol)	47,35

FONTE: O autor (2018).

A constante k_m está relacionada à afinidade que a enzima tem pelo substrato analisado. Segundo Whitaker (1994), quanto menor o valor de K_m maior a afinidade do catalisador pelo substrato. K_m também indica a concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima (MASTROENI E GERN, 2008). Já V_{max} representa a velocidade máxima que a reação enzimática pode atingir.

Em estudo de pectinase de *Aspergillus niger* foi encontrado K_m de 2,30 mg/mL (Khan et al., 2017). Enquanto Ezugwu et al. (2014) relatam K_m de 89,5 mg/mL para pectinase de *A. niger*. Os valores encontrados por Ma et al. (2016) foram K_m de 1,74 mg/mL e V_{max} de 18,08 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) para pectinase de *Penicillium janthinellum*. Logo, percebe-se que estes valores apresentam variações para as diferentes enzimas produzidas, sendo necessário, para uma efetiva comparação determinar-se a eficiência catalítica de cada enzima para determinado substrato.

A energia de ativação da enzima (E_a) corresponde à energia mínima necessária para ativação da reação enzimática. Por outro lado, a energia da reação de desativação (E_d) é a energia mínima necessária para iniciar a reação de desativação da enzima. Uma energia de ativação de 15,05 kJ/mol foi encontrada para pectinase produzida. Silva et al (2014) determinaram a energia de ativação de uma poligalacturonase que foi de 9,66 kJ.mol⁻¹.

A estabilidade térmica da enzima foi estudada nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80°C. Os parâmetros referentes à estabilidade térmica foram determinados por meio

da análise da atividade enzimática de pectinase sob o efeito das diferentes temperaturas sobre a atividade de pectinase. Os resultados encontram-se na Tabela 5.16.

TABELA 5.16 - PARÂMETROS DE ESTABILIDADE TÉRMICA DE PECTINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger*

Temperatura (°C)	K_d (min^{-1})	$t_{(1/2)}$ (min)	Valor D (min)	Valor z (°C)
50	0,0032	216,60	719,56	
60	0,0112	61,88	205,58	46,95
70	0,0184	37,67	125,14	
80	0,0139	49,86	165,65	

FONTE: O autor (2018).

Os valores experimentais da constante cinética de desnaturação térmica (k_d) foram obtidos para cada temperatura analisada. De acordo com os dados obtidos é possível perceber que as constantes k_d são inversamente proporcionais às $t_{(1/2)}$.

O tempo de meia-vida $t_{(1/2)}$, corresponde ao tempo necessário para que a enzima sofra perda da metade da atividade inicial. Os tempos obtidos indicam que estes valores diminuem à medida que a temperatura do meio reacional aumenta, o que está relacionado à desnaturação térmica da enzima. Entretanto, a enzima apresentou mais altos $t_{(1/2)}$, 216,60 e 61,88 min, na faixa de 50°C a 60°C, respectivamente, mostrando que a enzima pode ser utilizada em processos dentro dessa faixa de temperatura.

O valor de redução decimal D é o tempo necessário para reduzir a velocidade de reação a 10%. A partir dos resultados pode-se perceber que a enzima é mais estável em temperaturas próximas a 50 °C, na qual o valor D foi de 719,56 min.

O valor z corresponde à diferença de temperatura para a qual ocorre aumento ou diminuição do valor D. O fator z para a pectinase produzida foi de 46,95°C.

Em trabalho realizado por Silva et al (2014), foram determinados os parâmetros cinéticos para uma poligalacturonase na temperatura de 50°C: k_d igual a 0,0086 (min^{-1}), $t_{(1/2)}$ igual a 80,59 (min) e 267,79 (min) para o valor D. Tais resultados

demonstram que a pectinase produzida neste trabalho apresenta maior termoestabilidade para a temperatura de 50°C.

5.7 FORMULAÇÃO LÍQUIDA E ESTABILIDADE DE PECTINASE

A pré-seleção dos aditivos e as concentrações testadas para a formulação do extrato enzimático pectinolítico foi estabelecida conforme LIBARDI JÚNIOR (2018), ANVISA (2007) e ANVISA (2014). Os ensaios de estabilidade acelerada foram realizados nas condições ótimas de atividade da enzima (50°C e pH 4) onde a atividade da enzima foi avaliada durante 15 dias. Os aditivos testados e as atividades enzimáticas relativas após 15 dias estão apresentados na Tabela 5.17.

TABELA 5.17 - ESTUDO DO EFEITO DE ADITIVOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO INICIAL DE FORMULAÇÃO DE PECTINASE PRODUZIDA EM CONDIÇÕES ACCELERADAS

Função	Aditivo	Concentração (m/v)	Atividade enzimática residual (%)
Poliol	Sorbitol	54,6	26,08 ± 0,76
Ácido	Ácido benzoico	0,05	22,85 ± 1,46
Sal	Benzoato de sódio	0,25	34,66 ± 0,40
Poliol	Xilitol	45,6	29,40 ± 0,92
-----	Controle	-----	25,38 ± 1,11

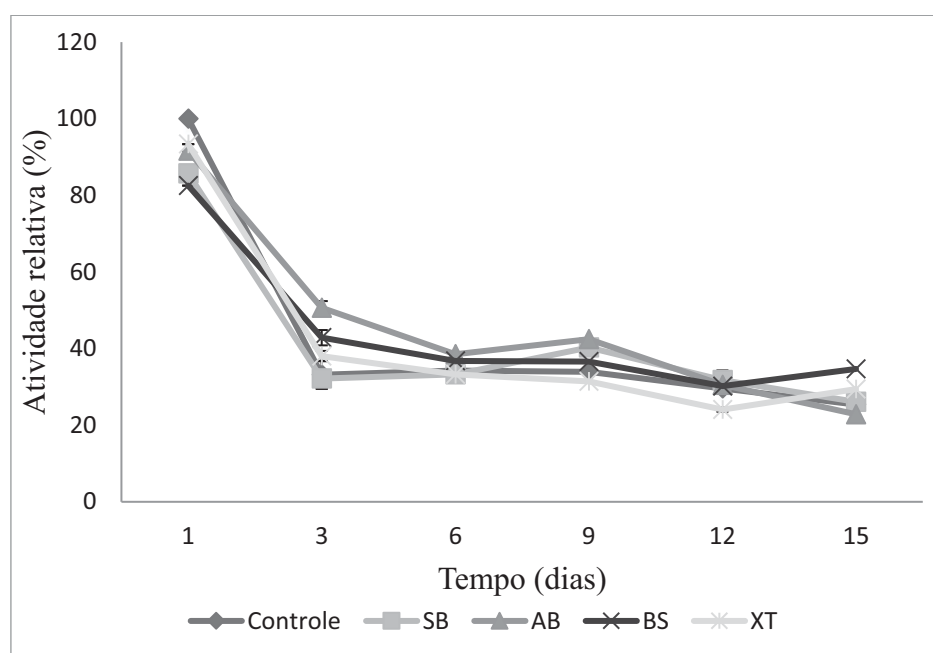
FONTE: O autor (2018).

Após um período de incubação de 15 dias a 50°C, foi possível observar que o Benzoato de sódio, um sal, e o xilitol, um polioli, propiciaram a manutenção de maiores atividades enzimáticas relativas, sendo elas 34,66% e 29,40%, respectivamente. Os demais aditivos testados, sorbitol, um polioli, e o ácido benzoico, um ácido, tiveram efeito menos significativo sobre as atividades enzimáticas relativas, sendo 26,08% e 22,85%, respectivamente.

O perfil de atividades enzimáticas relativas ao longo do tempo de 15 dias para todos os aditivos testados pode ser visto na Figura 5.8. Um fato interessante a se observar é que, a partir do 3º dia de exposição da enzima à temperatura de 50°C, quando há grande redução da atividade enzimática, esta é mantida praticamente constante até os 15 dias de incubação. Essa característica poderá ser determinante

quando da avaliação da estabilidade de pectinase armazenada sob refrigeração. Outro detalhe é que a amostra controle (sem aditivos) apresentou um mesmo perfil do que as amostras que receberam aditivos.

FIGURA 5.8 - PERFIL DO EFEITO DE ADITIVOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO INICIAL DE FORMULAÇÃO SOBRE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RELATIVA DE PECTINASE DURANTE 15 DIAS



Sorbitol (SB); ácido benzoico (AB); benzoato de sódio (BS) e xilitol (XT).

A ANOVA dos dados referentes a esta etapa inicial revelou uma diferença não significativa entre os aditivos testados ($p = 0,99$), para um valor $p < 0,05$.

Tendo por base os resultados para este teste inicial, realizou-se um planejamento experimental fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais com um total de 7 experimentos utilizando dois aditivos selecionados, o benzoato de sódio e xilitol, ambos selecionados por terem propiciado a manutenção de maiores valores de atividade relativa (ensaios de seleção de aditivos). Os resultados para o planejamento experimental mantiveram atividade residual mantida em 100%, após o período de 15 dias.

Com uso do software Statistica® 7.0 (Statsoft, USA), a ANOVA mostrou que os efeitos não foram significativos entre si com (valor de $p < 0,05$) nas concentrações

avaliadas. Entretanto, mesmo não apresentando uma significância ao nível de 0,05%, o xilitol sozinho apresentou maior efeito do que a interação de ambos os aditivos.

Tendo-se em consideração que os fatores independentes do planejamento experimental não apresentaram efeitos significativos entre si, porém, permaneceram estáveis, procedeu-se estudo com os mesmos aditivos (benzoato de sódio e xilitol) nas menores concentrações avaliadas em planejamento experimental, para verificar os resultados de estabilidade.

Nos experimentos de estabilidade em longo prazo, as formulações foram compostas pelo extrato enzimático adicionado de benzoato de sódio e xilitol e extrato enzimático sem aditivos, como controle do ensaio. Ambas as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C, durante 60 dias.

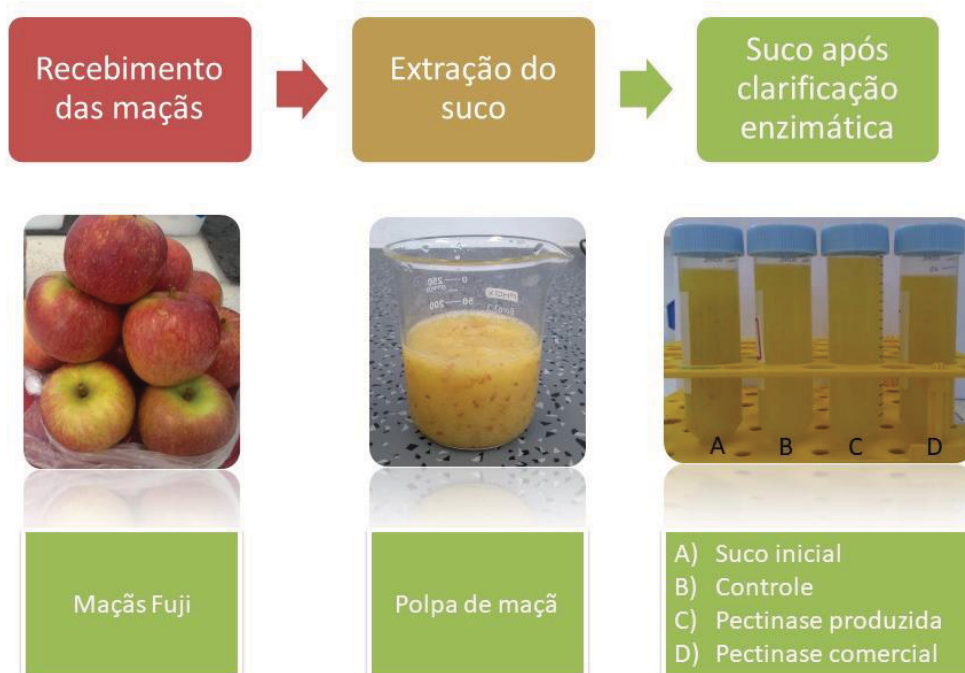
Após incubação durante 60 dias a combinação do benzoato de sódio mais o xilitol levou a um decaimento da atividade relativa, a qual permaneceu com 92,41%, enquanto que o controle apresentou atividade relativa abaixo do valor inicial, obtendo 90,37% de atividade relativa. A estabilidade enzimática precisa ainda ser avaliada em tempos mais longos, tais como 90 e 120 dias, de modo a se poder avaliar o real efeito dos aditivos na formulação. O benzoato de sódio é um dos principais agentes antimicrobianos usados nas indústrias de alimentos e bebidas, evitando assim a degradação de produtos (Santos, 2012), o que pode ser visto neste estudo, uma vez que nenhuma das amostras, nem o controle apresentaram sinais de contaminação microbiana.

5.8 CLARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO SUCO DE MAÇÃ

Uma das principais aplicações das pectinases compreende seu uso na indústria de bebidas, em virtude da sua capacidade de melhorar a prensagem de frutas e clarificação, o que tem por efeitos significativos aumento nos rendimentos e melhoria da cor e clareza (VENKATESH E UMESH-KUMAR, 2005).

A maçã é uma fruta de valor nutritivo em que o suco é uma forma viável de prolongamento do tempo de prateleira dessa fruta, o que implica na necessidade de elaboração de sucos com características apreciáveis. Na Figura 5.9, estão as etapas do processo de clarificação do suco de maçã que foram desenvolvidas neste trabalho.

FIGURA 5.9 - ETAPAS DO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE MAÇÃ



FONTE: O autor (2018).

A partir dos experimentos realizados, são apresentados na Tabela 5.18 os resultados obtidos para o processo enzimático de clarificação de suco de maçã por pectinase produzida, realizado com o tempo de incubação de 60 min.

TABELA 5.18 - PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE O PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA POR PECTINASE EM SUCO DE MAÇÃ COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 60 MIN

Amostra	pH	Turbidez (NTU)	Viscosidade (cP)*	Vazão (mL/s)	°Brix
Controle	4,21 ± 0,01	589,00 ± 2,64	1,18 ± 0,02	1,62 ± 0,30	8,13 ± 0,09
Pectinase (Sigma)	3,82 ± 0,01	415,83 ± 4,83	1,29 ± 0,02	1,36 ± 0,19	9,03 ± 0,04
Extrato enzimático (CauPec)	4,13 ± 0,01	408,89 ± 0,15	2,31 ± 0,09	1,21 ± 0,48	9,57 ± 0,38

*centipoise (cP = 0,001 Pa.s) - Unidade de Viscosidade Absoluta ou também conhecida como Coeficiente de Viscosidade Dinâmica. FONTE: O autor (2018).

É possível observar que o valor de pH observado para o suco tratado com a enzima CauPec está próximo aos valores encontrados para o suco não tratado (controle) e suco tratado com a enzima pectinase comercial (Sigma), em torno de 4,0. Esse pH é considerado ótimo para CauPec, o que certamente favoreceu o processo.

Os valores de turbidez observados indicam um valor de 589,00 (NTU) para o experimento controle, enquanto que, para os sucos tratados com a CauPec e Pectinase (Sigma), os valores foram significativamente menores, sendo 415, 83 (NTU) e 408, 89 (NTU), respectivamente. Em relação ao controle, a turbidez do suco de maçã diminuiu em 30,5%. É importante ressaltar que a Enzima CauPec foi obtida de fração ultrafiltrada, a qual pode conter outras enzimas e, portanto, deve-se considerar a possível atuação de outras enzimas no extrato, segundo CERRETI et al. (2017). Um efeito significativo e sinérgico do uso combinado de enzimas pectinases e proteases, por exemplo, pode ocorrer em termos de turbidez em clarificação de sucos.

As poulpas de sucos são compostas por matéria rica em pectina, quando este material é triturado a pectina que antes se encontrava insolúvel torna-se disponível em meio aquoso, aumentando sua viscosidade NADAROĞLU et al. (2010). Para verificar a atuação das enzimas testadas com relação à viscosidade, vemos que, este parâmetro apresentou resultados semelhantes para ambas enzimas avaliadas, um aumento na viscosidade em relação ao controle. Estes resultados isoladamente são insuficientes para indicar qual enzima exerceu maior ação catalítica.

Outro parâmetro analisado foi a vazão volumétrica para as amostras após o processamento e reação enzimática. A vazão volumétrica para as três amostras apresentou valores bem próximos entre si, indicando que para este parâmetro as atividades enzimáticas não apresentam diferenças. A liberação de fibras e compostos menores pela ação da enzima pode estar influenciando na vazão.

Com relação ao parâmetro °Brix, pode-se dizer que ocorreu um aumento gradual conforme o tratamento enzimático. A amostra controle, sem tratamento enzimático, apresentou 8,13 °Brix, enquanto que a amostra tratada enzimaticamente com a enzima CauPec apresentou 9,57 °Brix, indicando uma maior quantidade de sólidos solúveis totais na amostra, o que representa um aumento de 18% na concentração de sólidos em suspensão em relação ao controle. É possível, nesse caso, considerar que a degradação da parede celular da biomassa de poulpas, quando realizada por ação enzimática, a depender do tipo de enzima (SHARMA; PATEL E SUGANDHA, 2016), resulte na liberação de sólidos solúveis pela degradação de alguns polímeros constituintes. A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular (PALUDO E KRÜGER, 2011).

Em estudo de clarificação de suco de banana, realizado por BARMAN et al. (2014), revelou que o maior efeito de clarificação foi alcançado quando o suco de banana cru foi incubado a 60 min com 2% de concentração de pectinase parcialmente purificada.

Na sequência, foram realizados tratamentos enzimáticos de clarificação de suco de maçã em um tempo de 120 min. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.19.

TABELA 5.19 - PARÂMETROS ANALISADOS NO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA POR PECTINASE EM SUCO DE MAÇÃ COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 120 MIN

Amostra	pH	Turbidez (NTU)	Viscosidade (cP)*	Vazão (mL/s)	°Brix	Ác. Gal.* (µmol/mL)
Controle	4,21 ± 0,01	521,44 ± 2,07	1,15 ± 0,03	4,10 ± 0,44	7,60 ± 0,13	9,50 ± 0,04
Pectinase (Sigma)	3,67 ± 0,01	417,89 ± 2,81	1,19 ± 0,02	3,70 ± 0,44	8,00 ± 0,01	16,96 ± 0,02
Extrato (CauPec)	4,08 ± 0,01	448,89 ± 3,41	1,86 ± 0,03	3,48 ± 0,21	8,73 ± 0,16	16,77 ± 0,02

* centipoise (cP = 0,001 Pa.s) - Unidade de Viscosidade Absoluta ou também conhecida como Coeficiente de Viscosidade Dinâmica.

** Ácido Galacturunônico

No processo de clarificação realizado com tempo de incubação enzimática de 120 min, pode-se observar que os valores de pH não foram afetados. Ainda, tem-se que os valores para estes experimentos estão bem similares aos observados quando o tempo de tratamento enzimático foi de 60 min.

Para os valores de turbidez, é possível observar que assim como ocorreu quando o tempo de incubação foi de 60 min, a maior turbidez foi observada no experimento controle, ou seja, sem tratamento enzimático. Entretanto, para os demais tratamentos sob o efeito das enzimas CauPec e Pectinase comercial houve igualmente a redução da turbidez, sendo que a turbidez obtida após o tratamento com a CauPec foi de 448,89 NTU. A enzima comercial reduziu um pouco mais a turbidez do suco (417,89 NTU).

Os valores de viscosidade encontrados em ambos os estudos são bem similares para os correspondentes tratamentos (controle e enzima comercial). Contudo em relação ao ensaio anterior (60 min), ocorreu uma diminuição de

aproximadamente 19,50% na viscosidade, a qual caiu para 1,86 (cP). Tal fato demonstra que o tempo de tratamento enzimático influenciou na atuação da enzima CauPec durante a clarificação do suco de maçã.

Em relação à vazão volumétrica, ocorreu uma diminuição para os tratamentos enzimáticos realizados com a CauPec e pectinase (Sigma) se comparada ao controle, sendo o mesmo comportamento do ensaio de 60 min. Tal comportamento pode estar relacionado à ação enzimática mais intensa com maior quebra de constituintes das polpas de maçã, os quais dificultam a vazão.

Os valores encontrados de °Brix, assim como na primeira etapa, foram maiores para as amostras tratadas enzimaticamente, em especial a amostra sob ação da enzima CauPec, nas quais em ambos os tempos de incubação o °Brix foi maior. Para o tempo de 120 min, a concentração de sólidos em suspensão foi 15% maior do que no controle. Segundo Sharma et al (2014), a extração enzimática também aumenta a concentração de sólidos solúveis totais de suco de várias frutas, além disso, é importante considerar o uso de várias enzimas em diferentes combinações no aumento do teor de sólidos solúveis totais do suco, por exemplo, pectinase e celulasas. Segundo Cerreti et al (2017), a turvação encontrada em sucos logo após seu processamento pode ser devido a suspensão de partículas polissacarídicas.

Para os experimentos no tempo de incubação de 120 min, determinou-se ainda a concentração de ácidos galacturônicos liberados após a reação enzimática. Pode-se observar que as concentrações foram maiores nas amostras tratadas tanto com a enzima comercial quanto com a CauPec, sendo esse aumento de 76,5% para a pectinase produzida. Esse resultado comprova a efetiva ação enzimática da CauPec.

Em estudos com tempo e incubação de 120 min, realizado por (Mahmoodi; Najafpour e Mohammadi, 2017), os resultados mostraram que a enzima utilizada no tratamento de suco de maçã (enzima produzida a partir do estudo) reduziu a viscosidade do suco de maçã em torno de 7,2%.

Diante os resultados para o processo de clarificação de suco de frutas (maçãs), é possível inferir que a taxa de hidrólise enzimática depende de vários fatores, como tempo de incubação, temperatura e concentração de enzima (CERRETI et al., 2017).

Um extrato enzimático de pectinases de *A. niger*, utilizado para clarificação de suco de morango levou à redução de 60% na turbidez e 40% na viscosidade do suco (SANDRI E SILVEIRA, 2018). Em estudo, Zeni et al (2015), utilizando um complexo enzimático de pectinases obtidas por *Penicillium brasilianum* em clarificação de suco de pêssgo, alcançou uma redução de 11,66% na viscosidade e 13,71% na turbidez.

Ainda é possível notar que a literatura traz correspondência com outros estudos de clarificação de sucos por ação enzimática de pectinases, a exemplo de: romã - CERRETI et al., 2017; banana - BARMAN et al., 2014; abacaxi - DZOGBEFIA et al., 2001; maçã - MAHMOODI; NAJAFPOUR & MOHAMMADI, 2017; maçã - POLETTO et al., 2015; goiaba - NINGA et al., 2018; jaboticaba - PALUDO; KRÜGER, 2011; tamarindo - JOSHI et al., 2012.

Tendo em vista a importância dos processos de clarificação na indústria de sucos, vê-se o quão importante é o uso de enzimas pectinases para facilitação e otimização de tais processos. O processo de clarificação pode ser considerado como uma etapa necessária no processamento de suco de frutas, facilitando o aspecto visual do produto e final e, portanto, maior apreciação do mercado de consumo (CERRETI et al., 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final do trabalho pode-se concluir que:

1. As cepas de *Aspergillus niger* apresentaram potencial capacidade de produção de enzimas pectinases, tanto em meio de cultivo sintético, quanto em meio de cultivo a base de casca de cacau.
2. A casca de cacau e o extrato de pectina da casca são substratos potenciais para produção de enzimas pectinases.
3. As condições ótimas de meio de produção da pectinase foram de 110,25 g/L de casca de cacau, 5% (m/v) extrato de pectina e 0,05 g/L de extrato de levedura, com incubação à 28°C durante 96 h e agitação de 120 rpm e pH 4,0.
4. Os processos de separação e recuperação por precipitação com sulfato de amônio seguido de microfiltração e ultrafiltração por membrana foram bastante eficientes na recuperação das pectinases (118,52%).
5. A enzima produzida foi formulada com os aditivos benzoato de sódio e xilitol, e estabilidade foi testada nas condições acelerada de incubação, de 50°C, e também a longo prazo, a 4°C, mantendo-se estável em 92,41% após 60 dias
6. A enzima produzida pode ser aplicada em processos de clarificação de suco de maçã, pois apresentou resultados significativos e semelhantes a enzima comercial.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Mediante os resultados obtidos, algumas recomendações de experimentos futuros podem ser citadas:

1. Analisar atividade enzimática de outras possíveis enzimas produzidas concomitantemente às pectinases;
2. Realizar estudo de ampliação de escala (*scale-up*) para a produção da pectinase, possibilitando aplicações para escala piloto e industrial;
3. Estudar processos de secagem como por *spray-drying* e verificar a estabilidade das enzimas após etapa do processo, bem como realizar avaliação de estabilidade da enzima a longo prazo, por exemplo, 6 meses.
4. Estudar a caracterização do extrato enzimático obtido após as etapas de recuperação e purificação visando a determinação de compostos resultantes, identificando a pureza da enzima em relação aos demais constituintes.
5. Estudar estratégias para destinar os resíduos dos processos fermentativos a partir de abordagem socioambiental, a exemplo de sistemas de biorefinaria onde é adotada a *non-waste technology*.

REFERÊNCIAS

ABREU, R. L. de. Mapa municipio Tomé-Açu. Disponível em: < https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Para_Municip_TomeAcu.svg?uselang=pt >. Acesso em: dez 2018.

ADAPA, V. et al. Cold Active Pectinases: Advancing the Food Industry to the Next Generation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.5, p.2324-2337, 2014.

AHLAWAT, S.; BATTAN, B.; DHIMAN, S. S.; SHARMA, J.; MANDHAN, R. P. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 34, p. 763–770, 2007.

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, A.; B, NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 9, p. 148-154, 2016.

AJAYI, A. A. et al. Optimization of pectinase production by aspergillus niger using central composite design. **AFR. J. CLN. EXPER. MICROBIOL.**, v.19, n. 4, p. 314-319, 2018.

ALBERTON, L. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; ASSAMAN, R.; FENDRICH, R. C.; RODRIGUÉZ-LEÓN, J.; SOCCOL, C. R. Xylanase production by *Streptomyces viridosporus* t7a in submerged and solid-state fermentation using agro- industrial residues. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v.52 n. special: p. 171-180, 2009.

AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. 2011. 60f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 54, de 7 de outubro de 2014. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn.%2B54_2014_Enzimas%2Be%2Bprepara%25C3%25A7%25C3%25B5es%2Benzim%25C3%25A1ticas.pdf/39a26201-1b9a-4367-ac18-956912ea4505 >. Acesso: em set 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 5, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_05_2007_COMP.pdf/39e3737d-a1f5-49e6-84a1-c60f8475c1f7?version=1.0 >. Acesso em: set 2018.

BALENTIĆ, J. P. et al. Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. **Molecules**, 23, 1404, 2018.

BALLADARES, C. et al. Physicochemical characterization of *Theobroma cacao* L. sweatings in Ecuadorian coast. **Emirates Journal of Food and Agriculture.**, v. 28, n. 10, p. 741-745, 2016.

BARAZARTE, H. B.; SANGRONIS, E.; UNAI, E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. **ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION**, v. 58, n. 1, p. 64-70, 2008.

BARMAN, S.; SLT, NANDAN,; BADWALK, L, S,; DEKA, S. C. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. **J Food Sci Technol**, 2014.

BARRETO, E. da. **Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase do *Chrysosporthe cubensis***. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria** 3. ed. Campinas: UNICAMP, 2007. 480 p.

BERNAET, H.; RUYSSCHER, I. **Methods for Extraction Cocoa**. U.S. Patente 2013/0302473 A1, 14 November 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p. 248-254, 1976.

BUGA, M. L.; IBRAHIM, S.; NOK, A. J. Partially purified polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, n. 52, p. 8944-8954, 2010.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879–1900, 2009.

CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D. B.; CARDELLO, L.; GATTAS, E. A. de L. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus sp.* **Alim. Nutr.**, v. 16, n. 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.

CARVALHO, J.C. de.; MEDEIROS, A.B.P.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MAGALHÃES, A.I. JR.; SOCCOL, C.R. Approaches for the isolation and purification of fermentation products. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. **Current developments in biotechnology and bioengineering production, isolation and purification of industrial products**. Elsevier, 2017. 768-790p.

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

CERRETI, M.; LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; SPINELLI, S. E.; LOMBARDELLI, C.; ESTI, M. Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice. **Food Science and Technology**, 82, p. 58-65, 2017.

CHAN, SIEW-YIN; CHOO, WEE-SIM. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. **Food Chemistry**, n. 141, p. 3752–3758, 2013.

CHRONOPOULOS, D.; ZUURBIER, R. **Food comprising alkalized cocoa shells and method therefor**. JP2014176394 (A), 2014. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20140925&DB=&locale=en_EP&CC=JP&NR=2014176394A&KC=A&ND=4#>. Acesso em: nov 2018.

CHUNG, B. Y.; LIYAMA, K.; HAN, K. W. Compositional characterization of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Agric. Chem. Biotechnol.**, v. 46, n. 1, p. 12-16, 2003.

DAKO, E., BERNIER, A.M., DADIE, A.T., JANKOWSKI, K., 2012. The problems associated with enzymes purification. In: Ekinci, D. (Ed.), **Chemical Biology** 444p.

DAUD, Z.; KASSIM, A. S. M.; ARIPIN, A. M.; AWANG, H.; HATTA, M. Z. M. Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 9, p. 406-411, 2013.

DINU, D.; NECHIFOR, M. T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. **Journal of Biotechnology**, 131, p. 128–137, 2007.

DOMOZYCH, D. S. Cell wall evolution and diversity. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, JEAN-MICHAEL (Orgs) **Polysaccharides: bioactivity and biotechnology**. Springer International Publishing Switzerland, 2015, p. 55-80.

DZOGBEFIA, V. P.; AMEKO, E.; OLDHAM, J. H.; ELLIS, W.O. Production and Use of Pectolytic Enzyme from *Saccharomyces cerevisiae* for the Extraction of Pineapple Juice. **Food Biotechnology**, v. 15, n. 1, p 25-34, 2001.

ERKAN-KOÇ, B.; TURKYILMAZ, M.; YEMIS, O.; OZKAN, M. Effects of various protein- and polysaccharide-based clarification agentes on antioxidative compounds and colour of pomegranate juice. **Food Chemistry**, 184, p. 37–45, 2015.

EZUGWU, . L.; EZE, S. O. O.; SHILAKA, F. C.; ANYANWU, C. U. Production and characterization of pectinases obtained from *Aspergillus fumigatus* in submerged fermentation system using pectin extracted from mango peels as carbon source. **Plant Product Research Journal**, v. 16, p. 30 – 36, 2012.

FERNÁNDES, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. 2009. 126f Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2009.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de (Orgs) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010, 91-124p.

GULLÓN et al. Pectic oligosaccharides: manufacture and functional properties. **Trends Food Sci Technol**, 30, p. 153-61, 2013.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, 38, p. 987-996, 2003.

GUMMANDI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Proc. Biochem**, v. 38, p. 987-996, 2003.

HABRYLO, O.; EVANGELISTA, D. E.; CASTILHO, P. V.; PELLOUX, J.; HENRIQUE-SILVA, F. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 112, p. 499-508, 2018.

HANDA, S.; SHARMA, N.; PATHANIA, S. Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus sp.* C4 under solid state fermentation. **Fermentation**, v. 2, n. 10, 2016.

HARRISON, R. G.; TODO, P. W.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. **Bioseparations science and engineering**. 2 ed. Oxford University Press, 2015.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P. de.; BRAGA, A. R. C. KALIL, S. J. Kinetics and thermodynamic characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulfate. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 41-49, jan./mar. 2012.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Production of cocoa beans. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, XLII, 2016.

JACOB, N. Pectinolytic enzymes. In: NIGAN, P. S nee' (Orgs) **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**. Springer Science+Business Media B.V, 2009, p. 383-396.

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

JIANMIN, L. **Chocolate device that shells**. CN205865899 (U), 2017. Disponível em: https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?II=3&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20170111&CC=CN&NR=205865899U&KC=U#>. Acesso em: nov 2018.

JOSHI, A. A.; KSHIRSAGAR, R. B.; SAWATE, A. R. Studies on standardization of enzyme concentration and process for extraction of tamarind pulp, variety Ajanta. **Journal of Food Processing & Technology**, Los Angeles, v. 3, n. 2, p. 1-3, 2012.

JOSHI, A. A.; KSHIRSAGAR, R. B.; SAWATE A. R. Studies on standardization of enzyme concentration and process for extraction of tamarind pulp, variety Ajanta. **Journal Food Processing and Technology**, v 3, n 2, 2012.

JOSHI, V. K., PARMAR, M., & RANA, N. S. Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 253-256, 2006.

KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A Review. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.56 n.4, p. 679-689, July/Aug 2013.

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

KHAIRNAR, Y.; KRISHNA, V.; BORASTE, A.; GUPTA, N.; TRIVEDI, S.; PATTIL, P.; GUPTA, G.; GUPTA, M.; JHADAV, A.; MUJAPARA, A.; JOSHI, B.; MISHRA, D. Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p-13-17, 2009.

KHAN, N. J.; HAQ, I. U.; NAWAZ, A. REHMAN, A. U.; MUKHTAR, H. Kinetic and thermodynamic analysis of purified pectinases produced from nitrous acid mutant derivative of *Aspergillus niger* (H-97). **Pak. J. Bot.**, v. 49, n. 6, p. 2321-2324, 2017.

KILIKIAN, B. V. Filtração e centrifugação. In: PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos** (Orgs). Manole: São Paulo, 2005. 25-36p.

KLOCK, U.; ANDRADE, A. S. de. **Química da madeira**. 4 ed. Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2013.

KOWALCZYK, J. E.; LUBBERS, R. J. M.; PENG, M.; BATTAGLIA, E.; VISSER, J.; DE VRIES R. P. Combinatorial control of gene expression in *Aspergillus niger* grown on sugar beet pectin. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12356, 2017.

KUMAR, Y. S.; VARAKUMAR, S.; REDDY, O. V. S. Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.) peel using *Fusarium moniliforme* in solid state fermentation. **World J Microbiol Biotechnol**, 26, p. 1973–1980, 2010.

LÁ CÉCULAS Y SUS ORGANELOS - **Organelos no membranosos eucariotas**. Disponível em: <https://sites.google.com/site/lacelulaysusorganelos/student-of-the-month/johndoe> Acesso em: 03 nov. 2018.

LACHENAUD, P.; MOTAMAYOR, J. C. The Criollo cacao tree (*Theobroma cacao* L.): a review. **Genet Resour Crop Evol**, 64, p. 1807–1820, 2017.

LIBARDI JUNIOR, N. **Cellulase production, recovery, formulation and application - a wastewater biorefinery approach**. 2018. 186f. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia: Curitiba, PR, 2018.

LINEWEAVER, H. AND BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of American Chemical Society**, 56, 658, 1934.

LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018

LIU, X; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: BRAHMACHARI, G.; DEMAIN, A, L.; ADRIO, J. L. (Org.) **Biotechnology of microbial enzymes production - biocatalysis and industrial applications**. 2017.

LOPES, U. V.; PIRES, J. L. Botany and production of cocoa. In: **Cocoa and coffee fermentation**. (Orgs.) SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. CRC press Taylor & Francis group, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1 ed. Nova Odessa, São Paulo. Editora Plantum, 1992. 385p.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V.; PESSOA JÚNIOR, A. Precipitação. In: PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. (Orgs) **Purificação de produtos biotecnológicos**. Manole: Barueri, SP, 2005. 89-112 p.

MA, Y.; SUN, S.; HAO, H.; XU, C. Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. **An. Acad. Bras. Cienc.** (1 Suppl.), 88, p. 479-487, 2016.

MAHESHA, M; ARIVIZHIVENDHANA, K.V.; MAHARAJAA, P.; BOOPATHYB, R.; HAMSAVATHANIC, V.; SEKARANA, G. Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbono (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 133, p. 43–54, 2016.

MAHMOODI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M. Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 12, p. 4123–4128, 2017.

MAIA, T. F. **Aspergillus niger de interesse biotecnológico isolados de solo e serapilheira**. 2014. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

MASTROENI, M. F.; GERN, R. M. M. **Bioquímica: práticas adaptadas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

MATHEW, J. J.; VAZHACHARICKAL, P. J.; SAJESHKUMAR, NK.; ASHOKAN, A. Amylase production by *Aspergillus niger* through submerged fermentation using

starchy food byproducts as substrate. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 6, p. 34-40, 2016.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA: Valor Bruto da Produção - Principais Produtos Agropecuários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/valor-da-producao-agropecuaria-de-2017-e-4-4-maior-que-no-ano-passado-2/2017-04-valor-bruto-da-producao-principais-produtos-agropecuarios.pdf>>. Acesso: em out 2018.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266–277, 2008.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MUKESH, K. D. J. et al. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 3, p. 369-375, 2012.

NADAROĞLU, H.; TASKIN, E.; ADIGUZEL, A.; GULLUCE, M.; DEMIR, N. Production of a Novel Pectin Lyase From *Bacillus pumilus* (P9), Purification and Characterisation and Fruit Juice Application. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 2, 2010.

NEGI, S.; VIBHA, K. Amylolytic enzymes: glucoamylases. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Orgs) **Current developments in biotechnology and bioengineering production, isolation and purification of industrial products**. Elsevier, 2017, p. 25-46.

NINGA, K. A.; SENGUPTA, S.; JAIN, A.; DESOBGO, Z. S. C.; NOS, E. J. Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. **Journal of Food Engineering**, 221, p. 158-166, 2018.

NOGREGA, R.; BORGES, C. P.; HABERT, A. C. Processos de separação por membranas. In: PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. (Orgs) **Purificação de produtos biotecnológicos**. Manole: Barueri, SP, 2005. 89-112 p.

OKIYAMA, D. C. G.; VAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 63, p. 103-112, 2017.

ORTIZ, G. E. et al. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 44, p. 197–211, 2017.

PALANIYAPPAN, M.; VIJAYAGOPAL, V.; VISWANATHAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 682-686, 2009.

PALUDO, M. C.; KRÜGER, R. L. Ação da enzima pectinase na extração do suco de jabuticaba. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 3, p. 279-286, set./dez. 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

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

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 567–573, 2010.

PEDROLI, D. P.; MONTEIRO A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes, *The Open Biotechnology Journal*, 3, p. 9-18, 2009.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, 33, p. 305–325, 1946.

POHLAN, H. A.; PÉREZ, V. D. Growth and production of cacao. Soils, plant growth and crop production - vo.iii.

POLETO, P.; BORSÓI, C.; ZENI, M.; SILVEIRA, da. Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juices clarification. **Food Sci. Technol**, Campinas, v. 35, n. 2, p. 391-397, Abr.-Jun. 2015.

RAJDEO, K.; HARINI, T.; LAVANYA, K.; FADNAVIS, N. W. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. **Food and Bioproducts Processing**, 99, p. 12–19, 2016.

RAJENDRAN, R.; KARTHIK SUNDARAM, S.; RADHAI, R.; RAJAPRIYA, P.; BALAKUMAR, C. Production and optimization of fungal pectinase from *Fusarium* sp. **International Journal of Current Research**, v. 33, n. 4, p. 254-258, 2011.

REBELLO, S.; ANJU, M. ANCEESH, E. M.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. **Rev Environ Sci Biotechnol**, 16, p. 381–394, 2017.

REDGWELLA, R. et al. Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of componente polysaccharides. **Food Chemistry**. 81, p. 103–112, 2003.

REGINATTO, C.; ROSSI, C.; MIGLIORANZA, B. G.; SANTOS, M. dos.; MENEGHEL, L.; SILVEIRA, M. M. da.; MALVESSI. Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. **Process Biochemistry**, 58, p. 1–8, 2017.

REINEHR et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RODRIGUES, C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; GOELZER, F. D.; SOBRAL, K. C. A.; CORAL, J. D.; CAMPIONI, T. S.; MACENO, M. A. C.; SOCCOL, C. R. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. 283-314p.

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

SANCHEZ MUNDO, M.L.; JARAMILLO FLORES, M.E.; ESPINOSA SOLIS, V.; CHÁVEZ-REYES, Y.; DÍAZ RAMÍREZ, M.; SALGADO CRUZ, M.P.; CALDERÓN DOMÍNGUEZ, G. Muffins enriched with cocoa shell fiber. In **Proceedings of the Fourth International Congress on Cocoa Coffee and Tea**, Torino, Italy, June 25-28, 2017; p. 124.

SANDRI, I. G.; SILVEIRA, M. M. da. Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. **Beverages**, 4, 48, p. 1-10, 2018.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. (Dissertação de Mestrado). 90p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

SANTOS, S. F. de M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pendúculo de caju como substrato**. 151 f. (Tese de Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2007.

SANTOS, V. P. S. dos. **Desenvolvimento de um método de detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná**. 98f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2012.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Orgs) **Biotechnologia industrial - Engenharia bioquímica**. Vol. 2. São Paulo: Blucher, 2001, 5-18p.

SHARMA, H. P.; PATEL, H.; SHARMA, S. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits-A review. **Trends in Post Harvest Technology**, v. 2, n. 1, p. 01-14, 2014.

SILVA NETO, P. J. da et al. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém, CEPLAC, 2001. 125p.

SILVA, E. C. da. **Produção, purificação e formulação de amilase e sua aplicação em panificação**. 2017. 165f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2017.

SILVA, J. C.; SIQUEIRA, J. G. W.; PORTO, T. S.; TERMODINÂMICA E CINÉTICA DAPOLIGALACTURONASE DE *Aspergillus japonicus* URM5620, p. 1208-1215 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014** [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher, 2015.

SILVA, T. A. da. **Caracterização química de polpas kraft recicladas obtidas por tratamento com oxigênio e sistema lacase-HBT**. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná: Curitiba, PR, 2005.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation process. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. (Orgs) **Developments in solid-state Fermentation**. Springer, 2008.

SINGHARIA, R.R; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, P. 13–18, 2009.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; APPU RAO, A. G. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 3-4, p. 411-417, 1999.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples**. In: NREL/TP-510-42621 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP). 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. In: NREL/TP-510-42618 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP). 2012.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of ash in biomass**. In: NREL/TP-510-42622 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP). 2018.

SORIANO, M.; DIAZ, P.; PASTOR, F. L. J. Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. **CURRENT MICROBIOLOGY**, v. 1, n. 50, p. 114–118, 2006.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **J. S. N.**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUMAN, V.; RAJU, K. J. Studies on the production and optimization of pectinase by *Aspergillus niger* ncim 616 using Mixed substrate under solid state fermentation. **JCBPS; Section B**, v. 7, n. 1, p. 256-266, 2017.

SURESH, B.; VIRUTHAGIRI, T. Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 8. P. 867-870, 2010.

TAKCI, H. A. M.; TURKMEN, F. U. Extracellular pectinase production and purification from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **International Journal of Food Properties**, 1532-2386, 2016.

TAKCI, M.; TURKMEN, F. U. Extracellular pectinase production and purification from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain, v. 19, n. 11, p. 2443-2450, 2016.

TAPPI. T 204 cm-97. Solvent extractives of wood and pulp. 2007, 12 p.

THANGARATHAM, T.; MANIMEGALAI, G. Optimization and production of pectinase using agro waste by solid state and submerged fermentation. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 3, n. 9, p. 357-365, 2014.

TURCOTTE, V., BLAIS, J.-F., MERCIER, G.; DROGUI, P. Use of cocoa shells as biofiltration support for the treatment of effluents from the food industry. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 36, n. 6, 1059-1070, 2009.

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

VANDENBERGHE, L. P. de S.; CARVALHO, J. C. de.; LIBARDI, N.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C. R. Microbial Enzyme Factories: Current Trends in Production Processes and Commercial Aspects. In: DHILLON, G. S.; KAUR, S. (Orgs) **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. London, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016, p. 1-22.

VENKATESH KS, UMESH-KUMAR S. Production of pectinases and utilization in food processing. In SHETTY, K.; PALIYATH, G.; POMETTO, A.; LEVIN, R. E. (Orgs) **Food Biotechnology**, London: Taylor and Francis, 329–48, 2005.

VENKATESH, K. S.; UMESH-KUMAR, S. Production of Pectinases and Utilization in Food Processing. In: SHETTY et al. (Orgs) **Food biotechnology**. 2 ed. Taylor & Francis Group, LLC., 2006

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. de. Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. **LWT - Food Science and Technology**, 49, p. 108-116, 2012.

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the **Food Sciences**. 2. ed. Davis: University of California, 1994. 625 p.

WOLF-MÁRQUEZ, V. E.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M. M.; OSORIO, G. A.; PATIÑO, F.; ALVAREZ, M. S.; RODRÍGUEZ, A.; SANROMÁN, M. A.; DEIVE, F. J. **Bioresource Technology**, 225, p. 326–335, 2017.

WORDPRESS - Classifying Cacao. Disponível em: <<https://chocolateclass.wordpress.com/2017/03/10/classifying-cacao/>>. Acesso em: 19 de jul de 2018.

YAPO, B. M.; GNAKRI, D. Pectic polysaccharides and their functional properties. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, JEAN-MICHAEL (Orgs) **Polysaccharides: bioactivity and biotechnology**. Springer International Publishing Switzerland, 2015, p. 1729-1750.

YU, P.; ZHANG, Y.; GU, D. Production optimization of a heattolerant alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* ZGL14 and its purification and characterization, **Bioengineered**, v. 8, v. 5, p. 613-623, 2017.

ZHENG, YU-XI; WANG, YUAN-LIANG; PAAN, J.; ZHANG, JIAN-RONG; DAI, Y.; CHEN, KUN-YAN. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid contente. **Bioresource Technology**, 2017.

ANEXO 1 - COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A4EC257

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A4EC257
 Usuário: Universidade Federal do Paraná
 CPF/CNPJ: 75.095.679/0001-49
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Theobroma cacao

Título da Atividade: Uso de sementes e casca de cacau para produção de biomoléculas

Equipe

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE	Universidade Federal do Paraná
CARLOS RICARDO SOCCOL	Universidade Federal do Paraná
GILBERTO VINICIUS DE MELO PEREIRA	Universidade Federal do Paraná
CRISTINE RODRIGUES	Universidade Federal do Paraná
LUIZ ALBERTO JUNIOR LETTI	Universidade Federal do Paraná
ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS	Universidade Federal do Paraná
PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA	Universidade Federal do Paraná
ANDERSON STEYNER ROZENDO	Universidade Federal do Paraná

ZULMA SARMIENTO VASQUEZ

Universidade Federal do Paraná

NATANIA MARTINS SABATH

Universidade Federal do Paraná

Hervé Louis Ghislain Rogez

Universidade Federal do Pará

Aristóteles Goes Neto

UEFS-UFMG

Resultados Obtidos

Outros resultados

Data do Cadastro:

07/12/2018 20:46:18

Situação do Cadastro:

Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 20:46 de 07/12/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN