

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Márcia Corrêa de Carvalho

**BIOPRODUÇÃO DE PECTINASE A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL
PARA A APLICAÇÃO EM PRODUTOS VEGETAIS**

Rio de Janeiro

2016

Márcia Corrêa de Carvalho

BIOPRODUÇÃO DE PECTINASE A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PARA
A APLICAÇÃO EM PRODUTOS VEGETAIS

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-
Graduação em Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Orientadora: Dra Maria Gabriela Bello Koblitz
Co-orientadora: Dra Ana Elizabeth Cavalcante
Fai

Rio de Janeiro

2016

DEDICO

Essa dissertação a Gabi e a Beth, a forma mais poderosa de ensinar é através do exemplo. Vocês são exemplos de sabedoria, dedicação, conhecimento e compromisso com as tarefas que lhes são confiadas. Obrigada por tantos ensinamentos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela oportunidade que me é concedida a cada dia quando abro os olhos e me desperto e posso viver o hoje. Podendo realizar esse trabalho que não resume apenas em um ganho acadêmico, mas que me fez e me faz crescer profissionalmente, pessoalmente e espiritualmente.

Agradeço aos meus pais Marilandi e Marcius pela confiança de acreditarem em um plano maior para confiar a minha vida, ao mesmo tempo não abrindo mão da minha educação, me direcionando, e me ajudando no que eu preciso, deixando minha trajetória leve. São pessoas maravilhosas, meus guias, são e serão minha referência e minha inspiração para toda a vida.

Agradeço aos meus irmãos, Júlia, Marcos Carol e Mariana, pessoas muito próximas que todos os dias me mostram que pessoas muito distintas, com pensamentos vontades e vidas diferentes possuem um elo que nos torna todos iguais, o amor.

Um dia irei amar a todos incondicionalmente como amo meus pais e meus irmãos.

Agradeço a minha orientadora Gabriela, que me fez conhecer a força dessa palavra (orientadora). Orientou meus passos, tanto no trabalho como em minha vida. Eu sempre admirei a Gabi por seu imenso conhecimento e sabedoria, e mesmo sendo uma grande pessoa permaneceu com uma característica tão bonita a humildade. Sempre me acordo de uma frase que ela me disse: “A única diferença que nos separa são os anos de experiência”.

Agradeço a minha co-orientadora Beth por tamanha dedicação e vontade, disposição e prontidão em ajudar, sempre com muito carinho e delicadeza. Em muitos momentos consegui fazer aflorar uma força interna que estava guardada, não me esqueço da frase, e continuo em busca “Somos uma jóia que precisa ser lapidada”.

Agradeço a minha prima, que tornou a minha ida ao Rio de Janeiro tranquila, e foi minha companheira no dia a dia durante muito tempo dessa curta e longa jornada.

Agradeço as pessoas do laboratório, especialmente a Cris, por ter me ensinado e me ajudado.

Agradeço a tudo e a todos que fizeram, fazem e irão fazer parte da minha vida, contribuindo para meu crescimento e aprendizagem.

RESUMO

Sabe-se que pectinases constituem um grupo de enzimas amplamente utilizadas em diferentes setores industriais como alimentício, farmacêutico, têxtil, de papel, entre outros, mostrando sua importância no mercado e a relevância de estudar este tema mais especificamente. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi otimizar a produção de pectinases por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de farinha de resíduo de maracujá, e aplicar na extração de suco da polpa do fruto cupuaçu. A fim de otimizar as condições do meio de cultura foi realizada uma sequência de planejamentos experimentais, variando teor de substrato e peptona, temperatura, agitação e pH. Primeiramente foi realizado um planejamento fatorial incompleto para determinar as variáveis de influência significativa, que foram: teor de farinha de resíduo de maracujá e peptona e temperatura. Em seguida foram realizados dois delineamentos centrais rotacionais, (1 e 2), nos quais, teor de farinha de resíduo de maracujá e temperatura foram significativos para a atividade. Quando a fermentação foi fixada em condições otimizadas de 50 % e 30 °C de farinha de resíduo de maracujá e temperatura, respectivamente, durante 24h e pH 5, alcançou-se a atividade pectinolítica total de 7,066 U/mL bem como atividade de poligalacturonase, pectina metil esterase, pectina liase e pectatoliase de 3,48; 0,079; 3,07 e 0,8 U/mL, respectivamente. A caracterização bioquímica parcial do extrato bruto enzimático mostrou que a enzima manteve mais de 70 % de atividade na faixa de temperatura testada (20 - 80 °C) e na faixa de pH testada de (2.0 - 8.0). O extrato bruto enzimático foi aplicado para a extração de suco da polpa de cupuaçu. A fim de alcançar a maior extração foi feito um delineamento central rotacional variando a agitação, temperatura e teor de extrato bruto enzimático do processo, durante 60 min. Avaliou-se turbidez, cor, rendimento e viscosidade. O tratamento enzimático proporcionou incremento de rendimento máximo, quando comparado ao controle, de 156 % a mais de suco extraído após filtração. Os valores ótimos para este processo revelados pelas superfícies de resposta foram: concentração da enzima, temperatura e agitação de 1%; 20°C e 200 rpm, respectivamente. Sob as condições otimizadas, o suco apresentou incremento de turbidez, viscosidade, rendimento e diferença de cor de respectivamente, 2267%; 97%; 0,93% e 30,76. O produto extraído em condições otimizadas apresentou: pH 3,6; densidade 1,038; atividade de água 0,96; umidade 91%; sólidos solúveis 9,4 °Brix; acidez total 3,86 g ácido cítrico/100mL; açúcares totais e redutores 6,27 g/100mL e 4,79 g/100mL e ácido ascórbico 11,11 mg/100g. Os resultados obtidos mostram que o resíduo de farinha de maracujá é um efetivo substrato alternativo para o desenvolvimento e produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae* e promoveu características enzimáticas promissoras para a extração de sucos.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Planejamento experimental sequencial; Pectinases; Resíduo agroindustrial; frutos tropicais

ABSTRACT

It is known that pectinases are a group of enzymes widely used in different industrial sectors such as food, pharmaceutical, textile, paper, and others, showing their importance in the market, and the relevance of studying this issue more specifically. In this sense, the objective of this study was to produce pectinases by yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* using passion fruit residue flour as an alternative substrate, and apply for extracting the juice of pulp of the cupuaçu fruit in order to optimize the culture medium conditions. One experimental planning sequence, using response surface methodology based on central composite design, varying concentration of substrate and peptone, temperature, stirring and pH. It was first made an incomplete factorial to determine significant influence variables that were: content of passion fruit residue flour and peptone and temperature. Then there were made two central composite design (1 and 2), in which, passion fruit flour residue and temperature were significant for the activity. When fermentation was set at the optimum condition of 50% and 30 ° C, passionfruit residue flour and temperature, respectively, at 24 and pH 5, reached pectinolytic activity total of 7,066 U / ml and polygalacturonase activity, pectin methyl esterase, pectin lyase and pectatolase 3.48; 0.079; 3.07 and 0.8 U / ml, respectively. The partial biochemical characterization of the enzyme crude extract showed that the enzyme showed more than 70% of the activity in the tested temperature range (20 - 80 °C) and in the pH range tested (2.0 – 8.0). The crude enzyme extract was applied to pulp of cupuassu for the juice extraction. In order to achieve greater extraction was made central composite design by varying the agitation, temperature and enzyme crude extract content of the process during 60 min. Was evaluated turbidity, color, yield and viscosity. The enzymatic treatment provided maximum yield increase when compared to the control sample 156% more juice extracted after filtration. The optimal values for this process revealed by the response surfaces were: enzyme concentration, temperature and stirring 1%; 20 °C and 200 rpm, respectively. Under optimized conditions and validated juice, showed an increase in turbidity, viscosity, yield and color difference respectively of 2267%; 97%; 0.93% and 30.76. The extracted product optimized conditions showed: pH 3.6; density 1.038; water activity 0.96; humidity 91%; soluble solids 9.4 brix; Total acidity 3.86 g citric acid / 100mL; total and reducing sugars 6.27 g / 100 ml and 4.79 g / 100mL and ascorbic acid 11,11mg / 100g. The results show that passion fruit flour residue is an effective alternative substrate for fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and its pectinase production. The enzymes proved promising for the extraction of juice

Key-word: *Saccharomyces cerevisiae*; Experimental sequential planning; Pectinases; Agroindustrial waste; Tropical fruits

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO.....	17
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PECTINAS	18
2.1.1 Ramnogalacturonana I (RGI)	18
2.1.2 Ramnogalacturonana II (RGII).....	18
2.1.3 Homogalacturonana (HG).....	19
2.1.3.1 Protopectina.....	19
2.1.3.2 Ácidos péctico	19
2.1.3.3 Ácido pectínico.....	19
2.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	19
2.2.1 Despolimerases.....	20
2.2.1.1 Poligalacturonases (PG)	20
2.2.1.2 Pectina liase (PL).....	20
2.2.1.3 Pectatoliase (PTL)	20
2.2.2 Desmetoxilantes – Pectina metil esterase (PME).....	21
2.2.3 Protopectinases.....	21
2.3 MERCADO DE ENZIMAS	23
2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	24
2.4.1 Microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas.....	24
2.4.2 Maximização da eficiência e redução de custos na produção de pectinases	27
2.5 APLICAÇÃO TECNOLÓGICA EM PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL	31
2.6 PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS	36
3.0 Objetivos	42
3.1 Geral	42
3.2 Específicos	42

Otimização estatística multivariável da produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de farinha de resíduo de maracujá

1. INTRODUÇÃO	45
2. METODOLOGIA	47
2.1 MICRORGANISMO.....	47

2.2 ESTRATÉGIA SEQUENCIAL DE PLANEJAMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	47
2.2.1 Meio de cultivo.....	47
2.2.2 Planejamentos experimentais	47
2.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA	49
2.4 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA TOTAL	49
2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO	50
2.5.1 pH e temperatura ótimos	50
2.5.2 pH e temperatura de estabilidade	50
2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	51
2.6.1 Atividade de poligalacturonase (PG).....	51
2.6.2 Atividade de pectina metil esterase (PME)	51
2.6.3 Atividade de pectina liase (PL)	51
2.6.4 Atividade de pectatoliase (PTL).....	52
2.RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1. MICRORGANISMOS	52
3.2. PLANEJAMENTOS SEQUENCIAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA TOTAL POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	53
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO ..	62
3.4.1 pH e temperatura ótimos	62
3.4.2 pH e temperatura de estabilidade	63
3.5. ATIVIDADE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	65
4. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

Aplicação de pectinase de *Saccharomyces cerevisiae* na extração de suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): uma otimização estatística do tratamento enzimático

1.0 INTRODUÇÃO	72
2.METODOLOGIA	73
2.1 AQUISIÇÃO E MANUTENÇÃO DAS POLPAS	73
2.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR <i>S. CEREVISIAE</i> E EXTRAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	73

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DO SUCO DE CUPUAÇU.	73
2.4 VARIÁVEIS DEPENDENTES	74
2.4.1 Rendimento	74
2.4.2 Turbidez.....	75
2.4.3 Cor.....	75
2.4.4 Viscosidade	75
2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO SUCO OBTIDO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.	75
2.5.1 Densidade	76
2.5.2 Atividade de água.....	76
2.5.3 Sólidos totais	76
2.5.4 Sólidos solúveis.....	76
2.5.5 pH.....	76
2.5.6 Acidez total.....	77
2.5.7 Açúcares redutores	77
2.5.8 Açúcares totais	77
2.5.9 Ácido ascórbico.....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLITICAS DE <i>S. cerevisiae</i>	77
3.2 TRATAMENTO ENZIMÁTICO - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	78
3.2.1 Turbidez.....	79
3.2.2 Cor.....	81
3.2.3 Rendimento	84
3.2.4 Viscosidade	85
4. VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E CARACTERIZAÇÃO DO SUCO OBTIDO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.	85
5. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE- MATERIAL SUPLEMENTAR	
1.METODOLOGIA	94
1.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDA DE ENZIMAS PECTINOLÍTICA.....	94
1.1.1 Solução mãe de ácido monogalacturônico	94
1.1.2 Curva padrão de DNS.....	94

1.1.3 Curva padrão de azul de bromotimol	95
1.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS	95
1.2.1 Obtenção e manutenção das leveduras	95
1.2.2 Meio mínimo	95
1.2.3 Extração de extrato bruto enzimático	96
1.2.4 Atividade pectinolítica total	96
1.2.5 Meio contendo FRM	97
1.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>S. CEREVISIAE</i>	97
1.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO SUCO DE CUPUAÇU	97
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
2.2 CURVA PADRÃO DE DNS	97
2.3 CURVA PADRÃO DE AZUL DE BROMOTIMOL	98
2.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS	99
2.4.1 Seleção de leveduras, a partir do meio indutor	99
2.4.2 Seleção de leveduras com o meio composto por FRM	99
2.5 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR <i>S. CEREVISIAE</i>	100
Análise estatística do DCCR1.	100
2.7 Tratamento enzimático do suco de cupuaçu	101
2.6.1 Turbidez	101
2.6.2 Cor	103
2.6.3 Rendimento	104
2.6.4 Viscosidade	105
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	106
CONCLUSÕES	108

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura de substâncias pécicas: representação esquemática	18
Figura 2. Cadeia linear de pectina formada por ácido galacturônico e ácido galacturônico metoxilado	19
Figura 3. Modo de ação das enzimas pectinolíticas de acordo com o substrato preferencial	21

“Otimização estatística multivariável da produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de farinha de resíduo de maracujá

Figura 4. Gráfico de Pareto dos experimentos referentes ao delineamento experimental fatorial incompleto.	54
Figura 5. Influência das variáveis “temperatura de cultivo (°C)” e “teor de farinha de maracujá (%)” na secreção da atividade pectinolítica total por <i>S. cerevisiae</i> . A) Curva de contorno e B) Superfície de resposta.	58
Figura 6. Influência das variáveis “teor de peptona (%)” e “teor de farinha de maracujá (%)” na secreção da atividade pectinolítica total por <i>S. cerevisiae</i> . A) Curva de contorno e B) Superfície de resposta.	59
Figura 7. Influência das variáveis “temperatura de cultivo (°C)” e “teor de farinha de maracujá (%)” na secreção da atividade pectinolítica total por <i>S. cerevisiae</i> . A) Curva de contorno e B) Superfície de resposta.	61
Figura 8. Influência do pH (A) e da temperatura (B) na atividade do extrato bruto pectinolítico	62
Figura 9. Influência do pH (A) após 60 minutos e (B) após 12 horas e da temperatura (C) na estabilidade do complexo pectinolítico	63

Aplicação de pectinase de *Saccharomyces cerevisiae* na extração de suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): uma otimização estatística do tratamento enzimático.

Figura 10. Influência das variáveis “agitação (rpm)” e “teor de extrato bruto enzimático (%)” na turbidez de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.	80
Figura 11. Influência das variáveis “agitação (rpm)” e “temperatura de reação (°C)” na diferença da cor (ΔE) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta	83
Figura 12. Influência das variáveis “agitação (rpm)” e “teor de extrato bruto enzimático (%)” na diferença da cor (ΔE) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta	83

APÊNDICE- MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 13. Curva padrão de ácido monogalacturônico com DNS	97
Figura 14. Curva padrão de ácido monogalacturônico com DNS	98
Figura 15. Curva padrão de ácido monogalacturônico com DNS	98
Figura 16. Curva padrão de ácido monogalacturônico com azul de bromotimol	98
Figura 17. Influência das variáveis “temperatura de incubação (°C)” e “teor de peptona” na atividade pectinolítica total. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.	100
Figura 18. gráfico de pareto turbidez, $p > 0,05$.	101
Figura 19. Influência das variáveis “temperatura de reação (°C)” e “agitação” no incremento da turbidez (Abs a 590nm) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.	102
Figura 20. Influência das variáveis “temperatura de reação (°C)” e “teor de extrato bruto enzimático (%)” na turbidez (Abs a 590nm) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.	102
Figura 21. Resíduos referente aos resultados de Turbidez Histograma de erros e B) Abs predito x Abs Observados	103
Figura 22. Gráfico de pareto da variável cor	103

Figura 23. Influência das variáveis “extrato bruto enzimático (%)” e “temperatura de reação (°C)” diferença da cor (ΔE) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta	104
Figura 24. Gráfico de pareto da variável rendimento	104
Figura 25. Gráfico de pareto da variável viscosidade	105

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Conteúdo de pectina g/100g em distintos frutos	23
Tabela 2. Microrganismo produtor de pectinases e forma de produção	25
Tabela 3. Microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas a partir de substratos alternativos	28

“Otimização estatística multivariável da produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de farinha de resíduo de maracujá

Tabela 4. Variáveis independentes e valores codificados e decodificados utilizados na estratégia sequencial de planejamentos experimentais visando uma maior secreção de pectinases pela levedura	48
Tabela 5. Delineamento experimental fatorial incompleto para seleção das variáveis que afetam significativamente a secreção de pectinases	54
Tabela 6. Matriz do delineamento composto central rotacional 1 e resposta em atividade pectinolítica total, após 24 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i>	57
Tabela 7. Matriz do delineamento composto central rotacional 2, resposta em atividade pectinolítica total e resultados preditos pela equação descritiva do modelo, após 24 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i>	59

Aplicação de pectinase de *Saccharomyces cerevisiae* na extração de suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): uma otimização estatística do tratamento enzimático.

Tabela 8. Variáveis independentes. Valores codificados e decodificados utilizados no planejamento experimental visando maior extração de suco de cupuaçu	74
Tabela 9. Matriz do delineamento composto central rotacional e respostas em incrementos de turbidez, rendimento, viscosidade e cor.	78
Tabela 10. Características do suco de cupuaçu	86

APÊNDICE- MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 11. Concentração do ácido monogalacturônico 8 - 0,4 mg/mL	94
Tabela 12. Atividade enzimática com o meio mínimo	99
Tabela 13. Resultado U/mL para cada linhagem de <i>S. cerevisiae</i> – FRM, em 24h de fermentação	99
Tabela 14. ANOVA DCCR1	100
Tabela 15. ANOVA DCCR2	101
Tabela 16. ANOVA referente a turbidez	102
Tabela 17. Análise estatística ANOVA dos resultados da cor	104
Tabela 18. Análise estatística ANOVA dos resultados do rendimento	105

LISTA DE SIGLAS

FRM- Farinha de resíduo de maracujá

DCCR - Delineamento central rotacional

DNS -Ácido 3,5 dinitrosalicílico

PG - Poligalacturonase

PME - Pectin metal esterase

PL - Pectin liase

PTL - Pectato liase

DCFI - 2,6-diclorofenolindofenol-sódio

CCMB - Coleção de Microrganismos do Estado da Bahia

CAGR - (*Compound Annual Growth Rate*)

SENAR – Serviço nacional de aprendizagem rural

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

FL – Fermentação líquida

FES – Fermentação em estado sólido

HG – Homogalacturônico

RGI – Ramnogalacturonana I

RGII - Ramnogalacturonana II

1.0 INTRODUÇÃO

Pectinas são macromoléculas de carboidrato, polissacarídeos, existentes nas células vegetais, componente majoritário na parede primária e na lamela média (MALLER et al., 2011). Como muitos polissacarídeos, a pectina é uma molécula heterogênea, apresentando diversos açúcares em sua composição, que variam de acordo com a fonte produtora, e as condições ambientais (SANTI et al, 2014). Dentre as substâncias pécticas mais estudadas estão a pectina, (formado em 75 % por ácido galacturônico (metoxilado), ácido péctico (formado por quantidade insignificantes de ácido galacturônico metoxilado) e protopectina (TAPRE E JAIN, 2015).

Devido à grande diversidade de substâncias pécticas e sua complexidade, são necessárias diferentes enzimas pectinolíticas com diversas formas de ação, a fim de degradar as variadas substâncias pécticas. Existem a poligalacturonase (PG), pectina metil esterase (PME), pectinaliase (PL) e pectatoliase (PTL). PG, PL e PTL são consideradas enzimas despolimerizantes, pois clivam a molécula de pectina entre os monômeros de ácido galacturônico, seja por hidrólise (PG) ou transeliminção (PL, PTL). A PME catalisa a desesterificação dos grupamentos metoxil da pectina (MARTOS et al., 2013). As enzimas catalisam diversas reações envolvidas na preparação de produtos, sendo uma ferramenta importante na indústria de alimentos.

O mercado de enzimas alimentício em 2015 foi de 4,5 bilhões de dólares, onde é feita a maior aplicação de enzimas industriais e são esperados um crescimento em uma taxa superior aos outros segmentos (Grand view research, 2016).

O Brasil é o maior exportador da indústria de frutas e vegetais, com uma parte considerável da produção focada no mercado norte-americano. Dentro deste segmento, produtos processados como sucos de frutas e vegetais representam os produto mais importantes, sua demanda esta em crescimento, devido à conscientização e preferência dos consumidores por produtos saudáveis (MARKETS AND MARKETS, 2016d).

A economia do Brasil é voltada a produção agrícola. Dessa produção 597 milhões de toneladas de resíduos são gerados por ano (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Cada tipo de matéria prima possui uma vantagem de aplicação tecnológica distinta, de acordo com a disponibilidade e local destes materiais. A biomassa de resíduos gerada demanda uma aplicação, uma alternativa é utilizá-lo para gerar um produto de valor agregado, as enzimas.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PECTINAS

As substâncias pécicas são polissacarídeos complexos, formados por diferentes monossacarídeos, ligados com diferentes ligações, agrupados em distintos tipos de cadeia (CANTERI et al., 2012; SHARMA et al., 2013). Os principais polissacarídeos pécicos estão representados esquematicamente na figura 1.

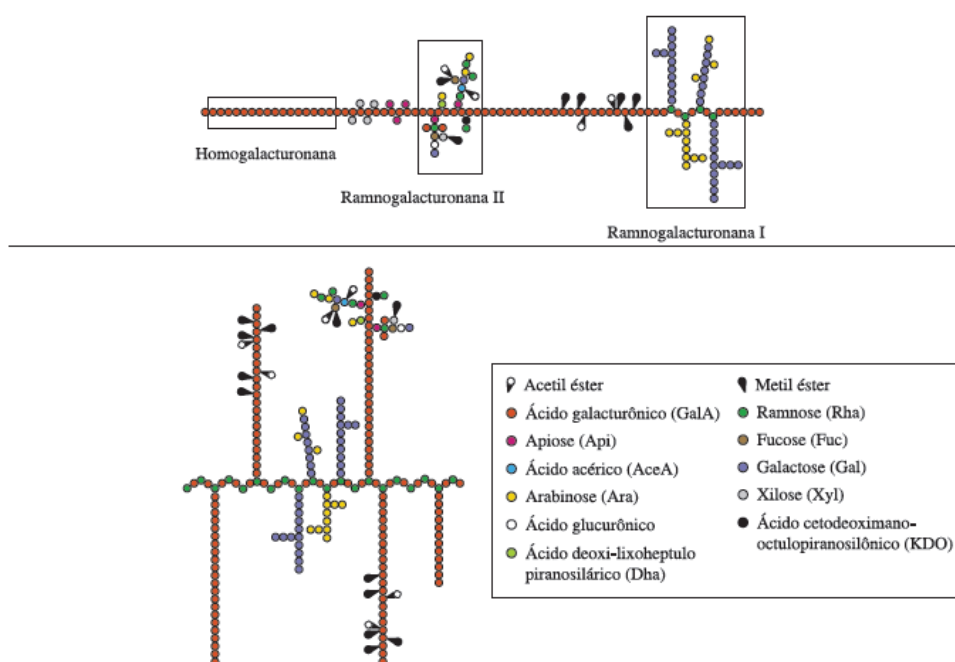


Figura 1. Estrutura de substâncias pécicas: representação esquemática

Fonte: Canteri et al., 2012

2.1.1 Ramnogalacturonana I (RGI)

Apresenta uma cadeia composta por diferentes dissacarídeos, principalmente arabinanas e galactanas, ligadas à unidades de ramnose (PEDROLLI et al., 2009; CANTERI et al., 2012).

2.1.2 Ramnogalacturonana II (RGI)

Polissacarídeo complexo, formado por longa cadeia linear, homogalacturonana ligado à cadeias laterais formadas por diferentes tipos de açúcares (PEDROLLI et al., 2009; CANTERI et al., 2012).

2.1.3 Homogalaturonana (HG)

Polímero linear formado por ácido D-galacturônico. A molécula é classificada de acordo com seu nível de esterificação (PEDROLLI et al., 2009). Dentre os polímeros lineares estão:

2.1.3.1 Protopectina

É uma substância péctica insolúvel em água (solúvel apenas com hidrólise ácida ou enzimática, fornecendo ácido pectínico ou péctico), formada a partir da associação das cadeias laterais de molécula de pectina com proteínas, hemicelulose e celulose (TAPRE e JAIN, 2014).

2.1.3.2 Ácidos péctico

São ácido galacturônicos ligados por ligação α -1.4 com quantidades insignificantes de ácidos metoxilados (PASHA, ANURADHA E SUBBARAO, 2013).

2.1.3.3 Ácido pectínico

Estes são ácidos galacturônicos ligados por ligação α -1.4 com 75% de ácidos metoxilados (pectina) (PASHA, ANURADHA E SUBBARAO, 2013).

A Figura 2 ilustra a cadeia linear de pectina, com ácido galacturônico e ácido galacturônico metoxilados, ligados por ligação glicosídica.

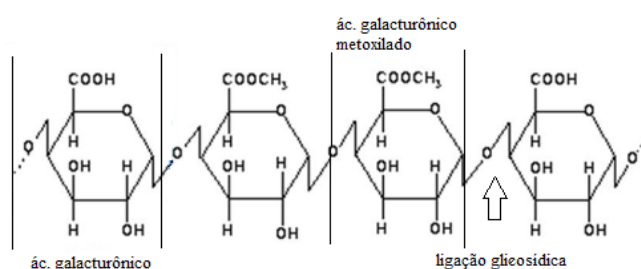


Figura 2. Cadeia linear de pectina formada por ácido galacturônico e ácido galacturônico metoxilado

Fonte: Adaptada de Khan, Bibi e Zeb, 2015

2.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Enzimas são proteínas, constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácido. As enzimas são catalisadores biológico, diminuem a energia de ativação de reações bioquímicas,

aumentando a velocidade que elas ocorrem. As enzimas ligam-se ao sítio ativo das moléculas de forma específica, se encaixando perfeitamente, são capazes de fazer parte das reações sem serem alteradas durante o processo (ADRIO e DEMAIN, 2014).

A classificação das enzimas pectinolíticas é baseada na preferência pelo substrato (desmetoxila, despolimeriza ou solubiliza), característica da forma de rompimento da ligação glicosídica, lise ou hidrólise e modo de ação (endoenzima ou exoenzima). São aqui apresentadas as enzimas desmetoxilantes, protopectinases, despolimerases (pectina liase, pectatoliase e poligalacturonases) (TAPRE e JAIN, 2014).

2.2.1 Despolimerases

As enzimas despolimerases, clivam a ligação glicosídica entre os substratos galacturônicos, via hidrólise (com a adição de uma molécula de água) da ligação glicosídica, as poligalacturonases ou via lise, rompendo a ligação glicosídica, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada das posições 4 e 5 pectina liases ou pectatolases (TAPRE e JAIN, 2014).

2.2.1.1 Poligalacturonases (PG)

São as enzimas mais extensivamente estudadas dentre pectinases, é a principal enzima com função hidrolítica, atuando sobre o ácido pectico (JAYANI, et al. 2005; GOLÇALVES, 2008, SHARMA et al., 2013).

2.2.1.2 Pectina liase (PL)

São enzimas que atuam na lise de trechos dos polímeros pecticos formada exclusivamente por ácido galacturônico metoxilado, catalisando a ligação glicosídica. A atividade de pectina liase é considerada chave no processo de degradação da pectina porque sua atuação não requer a ação prévia de outras enzimas do complexo pectinolítico (SIEIRO et al, 2012; SHARMA et al., 2013).

2.2.1.3 Pectatoliase (PTL)

São liases que têm preferência por ácido pectico, agem catalisando a ligação glicosídica de ácidos galacturônicos não metoxilados (SIEIRO et al., 2012).

2.2.2 Desmetoxilantes – Pectina metil esterase (PME)

Estas enzimas atacam exclusivamente substratos metoxilados, catalisando a desesterificação dos grupos metoxilas da pectina. A PME hidrolisa a ligação éster em ácido galacturônico metoxilado, produzindo metanol e ácido pécico (SHARMA et al, 2013). A PME não modifica o comprimento da cadeia de pectina, porém altera algumas das propriedades do polímero, disponibilizando substrato para a ação de outras enzimas, como a poligalacturonase (UNEOJO e PASTORE, 2006).

2.2.3 Protopectinases

São enzimas que catalisam a hidrólise de protopectina insolúvel em água (GUMMADI E PANDA, 2003; BARRETO, 2012).

Na Figura 3, é possível observar como as enzimas pectinolíticas mais estudadas na literatura, atuam sobre uma molécula de pectina, conforme a classificação anteriormente mencionada.

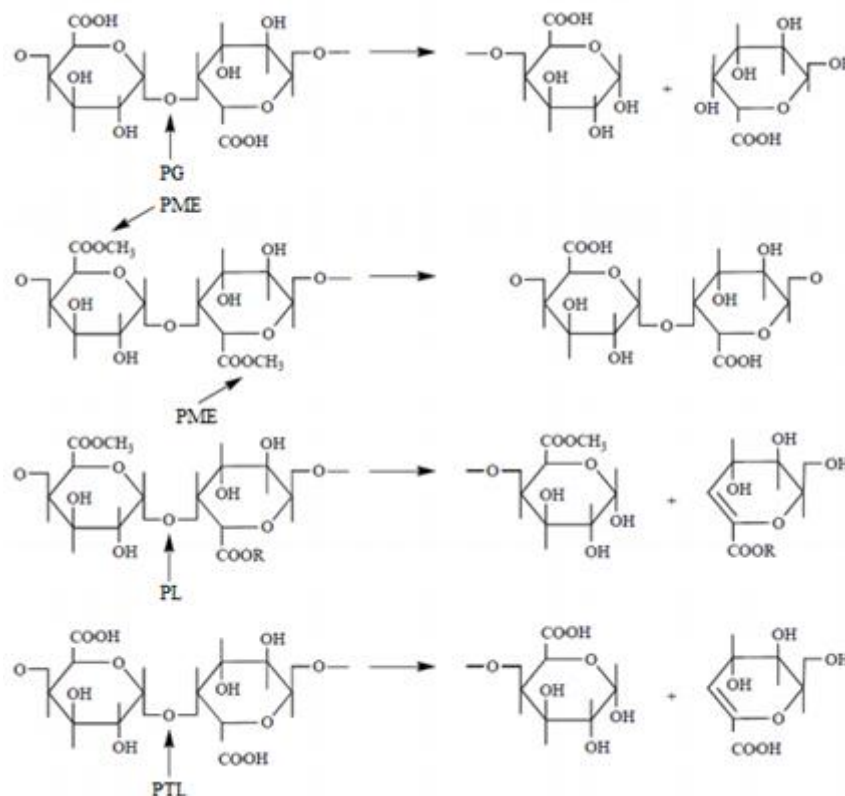


Figura 3. Modo de ação das enzimas pectinolíticas de acordo com o substrato preferencial

Fonte: Pedrolli et al., 2009

As enzimas desmetoxilantes e despolimerizantes são subdivididas de acordo com o modo de ação: endo, catalisando a remoção de grupos metoxílicos ou ocasionando a quebra das ligações glicosídicas das substâncias pécticas, de forma aleatória (randômica) ou modo de ação exo, no qual, o ataque ocorre a partir da extremidade terminal redutora (SAKAI, 1992; PEDROLI et al., 2009; TAPRE e JAIN, 2014).

Foram apresentadas algumas das enzimas que atuam em fração das substâncias pécticas, mostrando as diferentes formas de ação. Com base nos conceitos apresentados pode-se dizer que enzimas pectinolíticas formam um grupo heterogêneo de enzimas capazes de agir nas diversas substâncias pécticas, degradando e modificando suas cadeias (SANTI et al., 2014).

As substâncias pécticas estão presente nos frutos e vegetais. Devido a especificidade enzimática, enzimas pécticas são aplicadas em produtos tecnológicos, de origem vegetal, visando alcançar as características desejadas. Nos vegetais, a pectina localiza-se na parede celular superior associada a outros componentes. As células vegetais são envolvidas por uma parede celular rígida, dividida entre lamela média, parede celular primária e membrana plasmática. A parede celular é responsável pela estrutura e proteção dessas células composta principalmente por polímeros de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas (CANTERI et al., 2012). Por isso a pectina esta presente em todos os frutos, a tabela 1. Mostra alguns exemplos do teor de pectina em alguns frutos.

Tabela 1. Conteúdo de pectina g/100g em distintos frutos

Fonte	Pectina g/100g
Maçã (<i>Malus sp.</i>)	05-1,5
Caqui (<i>Diospyros Kaki</i>)	0,6
Polpa de beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1
Laranja (<i>Citrus cinensis</i>)	4-30
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,7
Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	15-40
Uva (<i>Vitis vinífera</i>)	0,2-1
Banana (<i>Musa acumiata</i>)	0,7-1,2
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Carambola (<i>Averrhoa carambola</i>)	0,7
Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	0,2-0,5
Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	0,8-1,0
Polpa de limão (<i>Citrus lemon</i>)	2,5-4,0
Lichia (<i>Lichi chinensis S.</i>)	0,4
Manga (<i>Mangifera indica L.</i>)	0,2-0,4
Mamão (<i>Carica papaya</i>)	0,7-1,0
Pêssegos (<i>Prunus persica</i>)	0,1-0,9
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	0,04-0,1
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6-0,7
Tamarindo (<i>Tamaridus indica L.</i>)	1,71
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	0,2-0,6

Fonte: Santi et al., 2014; Canteri, et al 2012

Diante do exposto, verifica-se a importância dessa enzimas para a tecnologia de alimentos.

2.3 MERCADO DE ENZIMAS

O mercado global de enzimas em 2015 foi de 8,18 bilhões de dólares, é esperado um crescimento significativo ao longo dos próximos oito anos devido as suas diversas aplicações. O mercado industrial é responsável por 56,9 % do mercado global, a principal área de

aplicação de enzimas, é no setor alimentício (KUMAR, 2015), em 2010 40 % da produção enzimática foi destinada ao mercado alimentício (LI et al., 2012). O mercado de enzimas alimentícias deverá chegar a 2,94 bilhões de dólares em 2021, com taxa composta anual de crescimento de 7,4% de 2016 a 2021 (MARKETS AND MARKETS, 2016c). O aumento na demanda de enzimas industriais de alimentos e bebidas é previsto devido ao aumento da renda per capita, e o conseqüente gasto com produtos alimentares processados. (Grand view research, 2016).

Carboidrases representou a maior quota no mercado de enzimas alimentares em 2015 e é projetada para ser o maior durante 2016-2021 com um crescimento a uma taxa composta (CAGR) de 7,5 %. Carboidrases compreende amilase, celulose, pectinase, lactase, que formam ingredientes vitais em alimentos e bebidas consumidos diariamente (MARKETS AND MARKETS, 2015c).

O mercado global de frutas e vegetais processados deverá atingir em 2021, 317,1 bilhões de dólares. A demanda por frutas e vegetais processados pode ser atribuído ao aumento da renda per capita e o tema da saúde ser muito abordado, os consumidores são capazes de comprar mais alimentos de alta qualidade e buscam alimentos de alto valor nutricional (IBISWorld Industry).

Diante das características do mercado de enzimas são necessárias estratégias de desenvolvimento de processos para essa produção, por isso o interesse da comunidade científica para a produção de enzimas em escala industrial, de forma a ser um processo ecologicamente e economicamente viável, sendo assim, há uma grande gama de estudos relacionados a otimização da produção de enzimas.

2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

2.4.1 Microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas

As células microbianas são importantes produtoras de enzimas, oferecendo uma série de vantagens, dentre elas: os microrganismos são relativamente fáceis de serem cultivados, possuem rápido crescimento, não requerem amplo espaço (o que contribui para que seja viável o controle das condições do ambiente), são passíveis a modificações genéticas, o que permite modificar as enzimas microbianas, gerando enzimas capazes de suportar condições

adversas e desfavoráveis a seu desempenho, essas características viabilizam o processo industrial (JOSHI e SATYANARAYANA, 2015; KUMAR, 2015).

No mercado, há forte interesse em enzima pectinolítica termoestável, apresentando resistência a altas temperaturas sem que a enzima perca sua ação, tornando sua aplicação tecnológica possível em processos que requerem temperaturas elevadas, processos tecnológicos conduzidos a elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos significativamente reduzidos e a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima (LIDSTRÖM et al., 2001, DELATORRE et al., 2010; JOSHI e SATYANARAYANA, 2015).

Enzimas pectinolíticas produzidas por distintos microrganismos possuem distintas característica (OYELEC et al., 2012), sendo vantajoso, pois aumentam as possibilidades de aplicação em distintos produtos, segundo Moyo et al. (2003) e Poondla et al. (2015) pectinases produzidas por leveduras normalmente possuem a característica de ter a atividade de PME reduzida, o que diminui a liberação de metanol no meio reacional, sua aplicação é requerida em processos no qual a formação de álcool não é interessante. Já pectinases produzidas por linhagens de fungos filamentosos, proporcionam uma alta atividade PME.

A estabilidade física de uma enzima é um parâmetro importante para a sua aplicação em processo industrial, a manutenção de um nível de atividade durante um longo período de tempo a diferentes temperaturas e valores de pH, faz com que a enzima possa ser aplicada em diversos processos e produtos (DELATORRE et al., 2010).

Pode-se observar a grande gama de microrganismos pectinolíticos existente, na Tabela 2, encontram-se alguns trabalhos que fazem referências a microrganismos capazes de produzir pectinases.

Tabela 2. Microrganismo produtor de pectinases e forma de produção

Microrganismos	Forma de produção	FONTE
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	FES	Martin et al., 2010
<i>Penicillium sp.</i>	FES	Patil e Chaudhari, 2010
<i>Fomes sclerodermeus</i>	FES	Salariato et al., 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	FES	Swain e Ray,

<i>Penicillium chrysogenum</i>	FES	2010 Banu et al., 2010
<i>Bacillus sp. AD 1</i>	FES	Dey et al., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	FES	Gomes et al., 2011
<i>Aspergillus sojae M3</i>	FES	Demir et al., 2012
<i>Aspergillus flavus</i>	FES	Johnson et al., 2012
<i>Pseudozyma sp. SPJ</i>	FES	Qureshi et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i>	FES	Vasanthi Meenakshisundaram, 2012
<i>Penicillium griseoroseum</i>	FL	Gonçalves et al., 2012
<i>Penicillium griseoroseum</i>	FL	Gonçalves et al., 2012
<i>Aspergillus. niger</i>	FES	Sandri et al., 2013
<i>Streptomyces sp.</i>	FES	Das et al., 2013
<i>Penicillium citrinum</i>	FES	EI-Batal et al., 2013
<i>Erwinia carotovora</i>	FES	Kothari e Baig, 2013
<i>Aspergillus niger</i>	FES	Roosdiana et al., 2013
<i>Rhizomucor pusillus</i>	FES	Siddiqui et al., 2013
<i>Rhodotorula glutinis MP-10</i>	FES	Taskin, 2013
<i>Aspergillus sojae</i>	FES	Demir e Tari, 2014
<i>Aspergillus niger HFD5A-1</i>	FES	Ibrahim et al., 2014
<i>Aspergillus niger HFD5A-1</i>	FES	Irshad et al., 2014
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	FES	Mandhania et al., 2014
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FL	Poondla et al., 2015
<i>Bacillus Licheniformis</i>	FL	Rehman et al., 2015
<i>Aspergillus ibericus</i>	FL	Mahesh et al., 2016

2.4.2 Maximização da eficiência e redução de custos na produção de pectinases

Visto que a produção de enzimas pectinolíticas a partir de microrganismos é vantajosa é importante também investigar como maximizar esse processo. Neste sentido, este item traz alguns exemplos de como obter uma produção eficiente e de baixo custo com base em trabalhos de autores citados na tabela 3.

Tabela 3. Microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas a partir de substratos alternativos

Microrganismo	Substrato Alternativo	Enzima	Atividade	FONTE
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo maracujá,	PG	20,9 U/g	Souza et al., 2010
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	Farelo de trigo e bagaço de laranja	PG	120 U/mL	Martin et al., 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e bagaço de cana	Pectinases	367,92 U/mL	Suresh e Viruthagiri, 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de laranja	Pectinases	6,8 U/g	Vivek et al., 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pele de uva	Pectinases	52,68 U	Villena et al., 2011
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Casca de laranja	Pectinases	30 U/g	Ezugwu et al., 2012
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Casca de abacaxi	Pectinases	28,39 U/g	Ezugwu et al., 2012
<i>Wickerhanomyces anomalus</i>	Casca de citrus	PG	51 U/mL	Martos et al., 2013
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	Pectinases	242 U/g	Biz et al., 2014
<i>Bacillus licheniformis</i>	Casca de laranja	PG	2,69 U/mg	Embaby et al., 2014
<i>Aureobasidium pullulans,</i>	Uva	Pectinases	1,65 U/mL	Merin et al., 2015
<i>Cryptococcus Saitoi</i>	Uva	Pectinases	0,86 U/mL	Merin et al., 2015
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Casca de laranja e amendoim	PG	6,285U/mL	Poondla et al., 2016

No item 3.1, foram reveladas algumas vantagens da produção de enzimas por microrganismos, outro ponto positivo é que para o crescimento de microrganismos se faz uso da fermentação. A fermentação em estado sólido (FES), em comparação com a fermentação líquida (FL) traz algumas vantagens para a produção enzimática, a fermentação sólida se assemelha ao habitat natural dos microrganismos, por isso, é preferida por eles para se desenvolverem, gerando maior rendimento da produção de enzimas, a FES proporciona enzimas brutas mais concentradas, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação (SINGHANIA et al., 2009; BASTOS, 2012; SOUZA et al., 2010). A fermentação permite o uso de resíduos agroindustriais como substratos, atuando como fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano, o uso de resíduos agroindustriais de baixo custo para a produção de enzimas em larga escala é uma das maneiras de reduzir significativamente os custos de produção (HEERD et al., 2012; PRAVEEN E SUNEETHA, 2014).

O Brasil é o segundo maior país fornecedor mundial de alimentos e produtos agrícolas (FAO, 2015). A produção agrícola gera uma quantidade muito grande de resíduos, criando uma demanda por sua utilidade, seu uso adequado ajuda a minimizar problemas ambientais, e podem gerar produtos com alto valor agregado, como as enzimas. Microrganismos necessitam de substratos que fornecem energia para seu crescimento, distintos substratos, são fontes distintas de carbono que influenciam no seu crescimento, como também na sua produção enzimática, que é significativamente maior durante o crescimento de microrganismos em meio contendo pectina natural quando comparados a açúcares simples (REHMAN et al., 2015; EMBABY et al., 2014).

Investiga-se a produção econômica e ecológica de pectinases para a aplicação industrial, para isso é necessário estirpes de microrganismos altamente produtivas além da busca por substratos alternativos, como resíduos agroindustriais para reduzir custos de produção. Trabalhos são feitos sobre a otimização da produção de pectinases utilizando resíduos agroindustriais como substratos alternativos. Existem exemplos da produção por fungos filamentosos como o trabalho de Suresh e Viruthagiri, (2010) que avaliaram a produção de pectinases por *Aspergillus niger* em diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana e em distintos tempos e determinaram que o ponto de rendimento máximo da enzima ocorreu em 96 h de fermentação, com substrato composto de 90% de farinha de trigo e 10% de bagaço de cana. Vivek et al. (2010), produziram pectinases por *Aspergillus niger*, a partir de extrato de casca de laranja, Souza et al. (2010) produziram através da FES utilizando

resíduo seco da casca e do albedo do maracujá (*Passiflora edulis*) a enzima PG por *Aspergillus niger*. A atividade de poligalacturonase teve maior performance em 66 h de processo, para 40% de umidade inicial e 1% da concentração da fonte de nitrogênio, a atividade obtida foi de 20,9 U/g. Martin et al. (2010) avaliaram 34 estirpes de fungos termofílicos, identificaram o isolado *Thermomucor* N31 com maior potencial produtor de PG. Este isolado foi submetido a condições de FES, este fungo produziu o máximo de 120 U/mL, enquanto que em FL produziu 13,6 U/mL, em meios com uma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja. Ezugwu et al. (2012) produziram pectinase por *Aspergillus fumigatus* a partir de, FL utilizando cascas de manga como uma fonte de carbono, a enzima foi submetida a um sistema de purificação. A atividade máxima de pectinase foi alcançada a 40°C, pH 5,5, a enzima foi usada para degradar as pectinas extraídas a partir de cascas de laranja e abacaxi as atividades foram de 30 U/mg e 28.39 U/mg, respectivamente.

Há trabalhos também sobre a produção de enzimas pectinolíticas por leveduriformes como: Martos et al. (2013) produziram e caracterizaram PG a partir de leveduras pectinolíticas, isolado de *Wickerhamomyces anomalus*, utilizando cascas de frutas cítricas como substrato e avaliaram a aplicação do sobrenadante na maceração de tecidos vegetais. A PG mostrou atividade máxima a pH 4,5 e em temperaturas entre 40 e 50 °C. Merin et al. (2015), identificaram os microrganismos pectinolíticos, capazes de sobreviver durante a fermentação natural da uva, foi detectado pelo sequenciamento do gene RNA as espécies pectinolíticas mais predominantes foram *Aureobasidium pullulans* seguidos por *Cryptococcus*. Poondla et al. (2016) avaliaram pectinases de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando como substrato resíduos agroindustrial, dentre eles eram 6 fontes de nitrogênio e 9 fontes de carbono. Sendo que a casca de laranja e amendoim, (fonte de carbono) apresentaram produção máxima de enzima de 6,285 U/mL.

Outra forma de otimizar um processo de produção biotecnológica é fazendo uso da ferramenta de planejamentos estatísticos, a fim de, alcançar a melhor resposta possível. Durante muito tempo, a otimização foi efetuada através do monitoramento da influência de um elemento de cada vez sobre uma resposta experimental (GRANATO E CALADO, 2011). As desvantagens desta técnica são: grande número de experimentos; efeitos interativos entre as variáveis não são estudados e efeitos reais e completos dos parâmetros sobre a resposta não são representados (LEE et al., 2006). A otimização multivariável faz uso da metodologia de superfície de resposta, como a ferramenta estatística que utiliza dados quantitativos do

delineamento experimental adequado para determinar e, simultaneamente, resolver equações multivariadas. A otimização multivariável é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para o desenvolvimento, e melhoria de processos em que a resposta de interesse é influenciado por diversas variáveis objetivando otimizar a resposta (GRANATO E CALADO 2011; SAGU et al., 2014).

Alguns trabalhos envolvendo metodologia de planejamento experimental, fazendo uso da metodologia de superfície de resposta estão descritos a seguir: A partir de leveduriforme, Villena et al. (2011) avaliaram pectinase produzida por *Saccharomyces cerevisiae* (CECT 11783), por fermentação em estado sólido, nos experimentos preliminares, avaliaram a produção de pectinases pelo microrganismos submetido a fermentação por uvas colhidas em distintas épocas do ano, as variações no tempo de colheita da uva não teve influência significativa para a resposta. Depois foi avaliada a atividade pectinolítica, variando a proporção de casca de uva e peptona, o aumento da concentração de casca de uva aumentou a atividade enzimática, depois foi feita a otimização do meio de cultura para a produção de pectinases variando o tempo de fermentação e agitação sendo que a agitação de 150 rpm proporcionou melhor atividade de pectinases. Embaby et al. (2014), em estudo preliminar avaliaram o impacto de seis resíduos agroindustriais e alguns substratos sintéticos na produção de pectinases por *Bacillus licheniformis* e estipularam a casa de laranja como melhor indutor. Depois foi variado o teor de substrato (casca de laranja), pH do meio e temperatura de incubação, todas as variáveis tiveram influência na resposta, sendo que o melhor ponto foi 1,5% (v/w), pH 8 e temperatura 37°C.

Além de mostrar características da produção de enzimas pectinolíticas por microrganismos a partir de substratos alternativos, este item mostra o grande número de trabalhos na área que investiga as alternativas de substratos que podem ser utilizados para a produção de enzimas pectinolíticas por microrganismos de forma a minimizar os custos de produção e/ou otimizando o processo fazendo uso da ferramenta de planejamento estratégico, facilitando a análise multivariável do processo.

2.5 APLICAÇÃO TECNOLÓGICA EM PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

Como visto no início desta seção a aplicação de enzimas pectinolíticas em alimentos de origem vegetal é de grande relevância, assim aqui são apresentados trabalhos que mostram a aplicação tecnológica dessas enzimas em diferentes setores industriais.

As enzimas pectinolíticas, por serem um grupo complexo de enzimas que degradam distintas substâncias pécnicas, possuem grande aplicabilidade no setor de produtos derivados de vegetais devido as características mencionadas ao longo do trabalho, tendo potencial aplicação na indústrias de frutas, papel e têxtil (GUMMADI e PANDA, 2003; KUMAR, 2015). Pectinases ácidas são amplamente utilizadas na extração, maceração, clarificação e remoção de pectina em frutos e vegetais, e são produzidas normalmente por fungos filamentosos. Pectinases alcalinas são produzidas por bactérias são usadas no pré-tratamento de águas residuais provenientes de setores alimentar vegetal em que os resíduos contém pectina; o processamento de fibras têxteis como linho, fermentação de café e chá, extração de óleos vegetais e o tratamento de papel (PEDROLLI et al., 2009).

Atualmente, as enzimas pectinolíticas são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado de enzimas em todo o mundo (KUMAR, 2015). O mercado global de frutas e vegetais detém uma parte importante da indústria de bebidas e o seu consumo deve crescer nos países em desenvolvimento, devido à crescente conscientização e preferência por produtos saudáveis (KUMAR, 2015; MARKETS AND MARKETS, 2016d).

O Brasil destaca-se como grande produtor mundial de frutas (OECD-FAO, 2015), o mercado de suco de frutas e vegetais do Brasil, deverá atingir cerca de 93,94 bilhões de dólares em 2021, em uma taxa de crescimento composta de 6% de 2016 a 2021. Com o crescimento do mercado de sucos de frutas e vegetais cresce a demanda por enzimas pectinolíticas que causam a degradação de moléculas longas e complexas chamadas pectinas, tendo um papel chave na indústria de suco auxiliando na extração e clarificação de sucos (GUMMADI e PANDA, 2003; POONDLA et al., 2015; KUMAR, 2015).

Frutas e vegetais contêm colóides que são principalmente polissacarídeos (longas cadeias de pectina, celulose, hemicelulose, lignina e amido), que reduzem o rendimento do suco extraído, a aplicação de enzimas pectinolíticas, despolimerizantes facilitam a filtração e aumentam o rendimento dos sucos, maceração e extração, estabilização da cor do caldo, elevando a qualidade destes produtos. Além de que pectinases aumentar a libertação de vários compostos fenólicos e outros componentes nutricional importantes no suco (SIEIRO et al., 2012; KUMAR, 2015).

Na clarificação de suco de frutas e vegetais, a enzima pectina metil esterase promove a desmetoxilação parcial da pectina liberando alguns grupos de ácido galacturônico carregados negativamente, estes grupos podem se combinar com cátions com forte capacidade de formar

complexos, principalmente cálcio, formando o precipitado de cálcio, e conseqüentemente formam flocos com fácil tendência à sedimentação, podendo ainda facilitar a etapa de filtração. O mecanismo de agregação das partículas tem início quando o núcleo da proteína que possui carga positiva é coberto pela molécula de pectina carregada negativamente. A degradação parcial da pectina pelas enzimas pectinolíticas resulta na agregação de partículas carregadas com cargas opostas. Em um ambiente ácido, geralmente sucos de frutas, as moléculas de pectina estão carregadas negativamente, causando o efeito de repulsão entre as partículas de mesma carga, que ficam suspensas, sendo responsáveis pela turbidez do suco, dessa forma, as enzimas pectinolíticas atuam degradando a pectina e expondo a parte carregada positivamente da proteína, permitindo que elas formem aglomerados que precipitam, depois de aglomerados com a filtração é mais fácil reter essas partículas fazendo com que o suco fique mais límpido (GARG et al., 2016).

Há muitos trabalhos relacionados à extração e clarificação de sucos, por pectinas de fungos filamentosos como: Kaur e Sharma, (2013) avaliaram a aplicação de enzimas pectínicas e celulolíticas, separadamente e juntas, para a extração do suco de cenoura a combinação das enzimas provocaram um aumento no rendimento de suco em 11,38%. Sandri et al. (2013) isolaram fungos filamentosos produtores de pectinases com o objetivo de utilizar suas enzimas na clarificação de sucos de maçã, uva e mirtilo. A estirpe foi identificada como *Aspergillus niger*. A enzima foi utilizada para o tratamento de sucos e comparado com duas preparações enzimáticas comerciais como: Pectinex Clear (PC) para o suco de maçã, e Pectinex BE para o suco de mirtilo. Depois do tratamento enzimático, os sucos tratados foram avaliados quanto aos parâmetros como viscosidade, turbidez, e clarificação, bem como a capacidade antioxidante, e teor total de composto fenólico, para o suco de mirtilo a pectinase pelo microrganismo apresentou melhores resultados que as preparações comerciais. Ismail, Abo-Elmagd e Housseiny (2016) avaliaram a produção de pectinases por seis isolados de fungos dentre eles, o *Trichoderma viride* EF-8, determinado como potencial produtor de enzimas pectínicas utilizando resíduo de cebola como substrato, sua enzima foi efetiva quando aplicada para clarificação de sucos de laranja, limão e maçã.

Trabalhos de pectinases por leveduriformes também são realizados como, Piemolini-Barreto, Antônio e Echeverrigaray (2015) avaliaram a maceração e clarificação de suco de uva por pectinases de *Kluyveromyces marxianus* em comparação com um preparado comercial. Ambas as pectinases proporcionaram maior rendimento do filtrado e menor

viscosidade. A adição de preparado enzimático produzido pelo microrganismo resultou em um suco com melhor intensidade de cor, e melhor extração de compostos fenólicos e antocianinas quando comparado com o suco adicionado de preparado comercial. Cerreti et al. (2016) trataram suco de romã com pectinase e/ou enzima proteolíticas analisando a clarificação, de acordo com a turbidez, teor de proteínas, fenóis e antocianinas do suco de romã que foram melhoradas, com enzimas pectinolíticas, em termos de níveis de turbidez do suco e o tratamento enzimático não modificou a composição de pectinas, proteínas e fenóis, nem a cor do suco.

Dentre os trabalhos relacionados à extração e/ou clarificação de sucos, alguns fazem uso de planejamentos estatístico, utilizando análise multivariável, como: Sagu et al. (2014) avaliou utilizando metodologia de superfície de resposta o efeito das variáveis temperatura e tempo de incubação e concentração de pectina comercial, avaliando teor de sólidos insolúveis, viscosidade e claridade do suco em polpa de banana filtrado. Barman et al. (2015) avaliaram a concentração do substrato, o tempo e temperatura de incubação para a produção de pectinase por fungo filamentosos, *Aspergillus niger* a partir de casca de banana e aplicaram a enzima para a clarificação de suco de banana. As condições ótimas de concentração do substrato, tempo e temperatura de incubação foram 8,07%, 65,82 h e 32,37 °C, respectivamente, e a atividade de PG obtida foi de 6,6 U/mL, o estudo também revelou que a maior clarificação foi conseguida com incubação do suco de banana durante 60 minutos com 2% de concentração de pectinase. Magro et al. (2016, b) estudaram o efeito de enzimas comerciais aplicadas a suco de uva para a extração do mesmo, variando concentração de enzima, tempo de incubação e temperatura de incubação.

Outra aplicação em produtos vegetais de pectinases é no processo de fabricação do vinho, auxiliando na extração de suco de uvas, maximizando o rendimento do suco, a enzima facilita a filtração, intensifica o sabor e a cor do produto (KUMAR, 2015). Enzimaticamente vinhos tratados enzimaticamente apresentaram maior estabilidade e possuem tempo de filtração reduzida em comparação com vinhos não tratados (JAYANI et al., 2005). Pectinases também estão sendo usados em biorrefinarias para hidrolisar a pectina presente em resíduos agroindustriais (BIZ et al., 2014). Estes resíduos são transformados em açúcares simples para posteriormente serem convertidos em bioetanol (HOSSAIN et al., 2011). Tratamento com pectinase acelera fermentação chá por quebrar a pectina, que está presente nas paredes celulares das folhas e destrói também a propriedade de formação de espuma do pó de chá

instantâneo, destruindo as pectinas. A fermentação também é responsável pelo desenvolvimento de aroma característico do chá (PRAVEEN E SUNEETHA, 2014).

Observa-se que a aplicação de enzimas é majoritariamente no setor alimentício para a extração e/ou clarificação de sucos de frutas. Preparados de enzimas pectinolíticas por microrganismo apresentam excelentes resultados para extração e clarificação de sucos de frutas quando comparados com preparados comerciais. Aumentam o rendimento do volume filtrado, produzem um suco com melhor intensidade de cor, melhor extração de compostos fenólicos, ou seja, melhor qualidade.

2.6 PERSPECTIVAS

A produção de enzimática a partir de resíduos é uma forma de processos de valor agregado. Processos fermentativos que empregam a utilização de resíduos agroindustriais constituem um dos métodos mais utilizados para a produção de enzimas, pelo qual os microrganismos retiram do meio em que estão acondicionados o material necessário para o seu crescimento, e ao mesmo tempo liberam no meio substâncias que poderão ser empregadas em processos industriais, produzindo um produto de interesse industrial, de valor agregado como as enzimas. A caracterização bioquímica e física da enzima produzida por distintos microrganismo precisa ser mais estudada para sua efetiva aplicação em produtos tecnológicos específicos, de forma a oferecer as melhores condições para determinados processos em particular, sendo possível maximizar a aplicação destas, o controle e melhores acompanhamentos do processo faz com que sua reprodutibilidade seja mais alta a nível industrial.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**. v.4, n.1, p.117 – 139, 2014.
- BANU, A. R.; DEVI, M. K.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP, B. V.; PALANISWAMY, M. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**. v.3, n.4, p.377 – 383, 2010.
- BARMAN, S.; SIT, N.; BADWAIK, 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. **Journal of Food Science and Technology**. v. 52, n. 6, p. 3579-3589, 2015.
- BARRETO, L. T. P. **Enzimas pectinolíticas de *kluyveromyces marxianus*: seleção e aplicação em processos da indústria de alimentos**. 2012. 111 f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2012.
- BASTOS, S. C. **Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries: condições de cultivo, purificação parcial e caracterização**. 2012. 133 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais 2012.
- BIZ, A.; FARIAS, F. C.; MOTTER, F. A.; PAULA, D. H.; RICHARD, P.; KRIEGER, A.; MITCHEL, D. A. Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works! **Plos one**. v.9, n.10, p. 10, 2014.
- CANTERI, M. H. G.; WOSIACKI, L. M. G; SCHEER, A. P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**. v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.
- MARTINA CERRETI, M.; LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; ESTI, M. THE effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. **LWT - Food Science and Technology**. v.73, p.326 -333, 2016.
- DAS, A.; BHATTACHARYA, S.; REDDY, N. V.; SUNDARA, R. S. Improved production and purification of pectinase from *Streptomyces sp.* GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat. **International Research Journal of Biological Sciences**. v.2, n.3, p.16 – 22, 2013.
- DELATORRE, B. A. **Produção de celulasas pelo microrganismo termofílico *Bacillus sp smia-2***. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro CAMPOS DOS GOYTACAZES – Rio de Janeiro– 2010.
- DEY, A.; KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Extracellular thermostable polygalacturonase from *Bacillus sp.* AD1. **Der Pharmacia Lettre**. v.3, n.2, p. 358 – 367, 2011.
- DEMIR, H.; GOGUS, N.; TARI, C.; HEERD, D.; LAHORE, M. F. Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonaseby solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain. **Turk Jounal Biology**. v.36, p.394 – 40, 2012.
- DEMIR, H.; TARI, C. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Industrial Crops and Products**. v. 54, p.302 – 309, 2014.

- EL-BATAL, AI.; OSMAN, E. M.; SHAIMA, I. A. M. Optimization and characterization of polygalacturonase enzyme produced by gamma irradiated *Penicillium citrinum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v.5, n.1, p.336 – 347, 2013.
- EMBABY, A. M.; MASOUD, A. A.; MAREY, H. S.; SHABAN, N. Z.; GHONAIM, T. M. Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from *Bacillus licheniformis*. **Springer Plus**. v.3, p.327, 2014.
- EZUGWU, A. L.; EZE, S. O. O.; CHILAKA, F. C.; ANYANWU, C. U. Production and characterization of pectinases obtained from *Aspergillus fumigates* in submerged fermentations system using pectin extracted from mango peels as carbon. **Plant Products Research Journal**. v.16, p. 30 – 36, 2012. Disponível em <<http://www.ajol.info/index.php/pprj/article/view/97922>>. Acesso em 20/jun. 2016.
- GARG, G. A. S.; KAUR, A. R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotechnology**. v. 6, n.1, p. 47, 2016.
- GRANATO, D.; CALADO, V. M. A. **Desenvolvimento e otimização de alimentos prebióticos e probióticos por técnicas estatísticas. In: Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2011. cap.11, p.255-267.
- GOLÇALVES, D. B. **Produção de pectin liase e poligalacturonase pela linhagem recombinante *Penicillium griseoroseum* T 20**. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**. v.89, n.4, p.281 – 287, 2011.
- GONÇALVES, D. B.; TEIXEIRA, J. A.; BAZZOLLI B., D. M. S.; QUEIROZ, M. V.; ARAUJO, F. E. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.1, p.140–146, 2012.
- GUMMADI, S. M.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: Review. **Process Biochemistry**. v.38, p.987-996, 2003.
- HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; LAHORE, M. F. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. In solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**. v. 90, n.2, p.102 – 110, 2012.
- HOSSAIN, A. B. M. S.; AHMED, S. A.; AHMED, M. A.; FARIS, M. A. A.; ANNUAR, M. S. M.; HADEEL, M.; NORAH, H. Bioethanol fuel production from rotten banana as an environmental waste management and sustainable energy. **African Journal Microbiol Research**. v.5, n. 6, p.586 – 598, 2011.
- IBRAHIM, D.; WELOOSAMY, H.; SHEH-HONG, L. Potential use of nylon scouring pad cubes attachment method for pectinase production by *Aspergillus niger* HFD5A-1. **Process Biochemistry**. v.49, p.660 – 667, 2014.
- IRSHA, M.; ANWAR, Z.; MAHMOOD, Z.; AQIL, T.; MEHMMOD, S.; NAWAZ, H. Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by

- Trichoderma viridi*; its purification and characterization. **Turkish Journal of Biochemistry**. v.39, n.1, p. 9 – 18, 2014.
- ISMAIL, A. S.; ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. A safe potential juice clarifying pectinase from *Trichoderma viride* EF-8 utilizing Egyptian onion skins. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 2016.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**. v. 40, n.9, p. 2931 – 2944, 2005.
- JOHNSON, A. A.; AYODELE, O. S.; AFOLAKE, O.; CHRISTIANA, O. M. Production of cellulase and pectinase from orange peels by fungi. **Nature Science**. v.10, n.5, p. 107 – 112, 2012.
- JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: Prospects and perspectives. **Bioresource Technology**. v.176, p. 273 – 283, 2015.
- KAUR, M.; SHARMA, H. K. Effect of enzymatic treatment on carrot cell wall for increased juice yield and effect on physicochemical parameters. **African journal of Plant science**. v. 7, n.6, p. 234-243, 2013.
- KHAN, M.; BIBI, N.; ZEB, A. Optimization of Process Conditions for Pectin Extraction from Citrus Peel. **Science, Technology and Development**. v.34, n.1, p.9 - 15, 2015.
- KOTHARI, M. N.; BAIG, M. M. V. Production and characterization of extracellular polygalacturonase by *Erwinia carotovora* MTCC 1428. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research** . v.4, n.1, p.981 – 998, 2013.
- KUMAR, S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. **Advances in Applied Science Research**. v.6, n.6, p.114 - 124, 2015.
- LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. V. S. A.; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, v.73, p.55 - 63, 2006.
- LIDSTROM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. Microwave assisted organic synthesis: a review. **Tetrahedron**. v.57, n. 45, p. 9225 - 9283, 2001.
- MAHESH, M.; ARIVIZHIVENDHAN, K. V.; MAHARAJA, P.; BOOPATHY, R.; HAMSAVATHANI, V.; SEKARAN, V. *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing Wastewater. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.133, p.43–54, 2016.
- Markets and Markets. **Food Enzymes Market worth 2.94 Billion USD by 2021**. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/food-and-beverage-enzymes.asp>>. Acesso em: 05 de agosto de 2016c.
- Markets and Markets. Setembro, 2016. **Fruit And Vegetable Juice Market: Global Trends, Forecasts & Market Estimates up to 2018**. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/fruit-vegetable-juice-market-999.html>>. Acesso em 7 de agosto 2016d.
- MARTIN, N.; GUEZ, M. A. U.; SETTE, L. D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by a Brazilian, thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation. **Microbiology**. v.79, n.3, p. 306–313, 2010.

- MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels **Biotechnology Research International**. p. 7, 2013.
- MAGRO, L. D.; DALAGNOL, L. M. G.; MANFROI, V.; HERTZ, P.; KLEN, M. P.; RODRIGUES, R. C. Synergistic effects of Pectinex Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice. **LWT - Food Science and Technol.** v. 72, p.157 - 165, 2016. b
- MERIN, M. G.; MARTÍN, M. C.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; AMBROSI, V. I. M. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. **Food microbiology**. v. 46, n. 3, p. 815-823, 2015.
- MENEGHEL, L.; REIS, G. P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochemistry**. v.49, p.1800 – 1807, 2014.
- MILLER, D. Configurations of strategy and structure: Towards a synthesis. **Strategic Management Journal**. v.7, n.3, p. 233 – 249, 1986.
- MOHAMADI, A. S.; SHAHBAZI, S.; BEHGAR, M.; FARD, S. M.; ASKARI, H. A study of pectinase enzyme activity changes in gamma- irradiated *Trichoderma reesei* mutants. **International Journal of Farming and Allied Sciences**. v.3, n.5, p.555 – 561, 2014.
- MOYO, S.; GASHEA, B. A.; COLLISONA, E. K.; MPUCHANEB, S. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**. v.85, p. 87–100. 2003.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en>. Acesso em: 07/07/2016.
- OYELEKE, S. B.; OYEWOLE, O. A.; EGWIM, E. C.; DAUDA, B. E. N. IBEH, E. N. Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**. v.5, n.1, p.78 – 83, 2012.
- PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; SUBBARAO, D. Applications of Pectinases in Industrial Sector. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technol.** v.16, n. 1, p. 89 – 95, 2013.
- PATIL, N. P.; CHAUDHARI, B. L. Production and purification of pectinase by soil isolate *Penicillium* sp. and search for better agro-residue for its SSF. **Recent Research in Science and Technology**. v. 2, n.7, p. 36 – 42, 2010.
- PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMORA, E. G. Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **Biotechnology Journal**. v.3, p.9 - 18, 2009.
- PIEMOLINI-BARRETO, L. T.; REGINA VASCONCELLOS ANTÔNIO, R. V.; ECHEVERRIGARAY, S. Comparison of a pectinolytic extract of *Kluyveromyces marxianus* and a commercial enzyme preparation in the production of Ives (*Vitis labrusca*) grape juice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 31, n.5, p.755 – 762, 2015.

POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM, R.; OBULAM, A. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4, p. 70-76, 2015.

POONDLA, V.; YANNAM, S. K.; GUMMADI, S. N.; SUBRAMANYAM, R.; OBULAM, V. S. R. Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 6, p. 40–50 2016.

PRAVEEN, K. G.; SUNEETHA V. Natural, Culinary Fruit Peels as a Potential substrate for Pectinolytic Enzyme. **Full Length Original Research Paper**. v. 6, n.3, 2014.

QURESHI, A. S.; BHUTTO, M. A.; CHISTI, Y.; KHUSHK, I.; DAHOT, M. U.; BANO, S. Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in a date syrup medium. **African Journal of Biotechnology**. v.11, n.62, p.12563 – 12570, 2012.

REHMAN, H. U.; SIDDIQUE, N. N.; AMAN, A.; NAWAZ, M. A. BALOCH, A. H. QADER, S. A. U. Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v.13, p.139 –144, 2015.

ROOSDIANA, A.; PRASETYAWAN, S.; MAHDI, C.; SUTRISNO, S. Production and characterization of *Bacillus firmus* pectinase. **J Pure App Chem Res**. v.2, n.1, p.35 – 41, 2013.

SAGU, S. T.; NSO, E. J.; KARMAKAR, S.; DE, S. Optimisation of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. **Food Chemistry**. v. 151, p. 182 - 190, 2014.

SALARIATO, D.; DIORIO, L. A.; MOUSO, N.; FORCHIASSIN, F. Extraction and characterization of polygalacturonase of *Fomes sclerodermeus* produced by solid-state fermentation. **Revista Argentina de Microbiología**. v.42, p.57 – 62, 2010.

SAKAI, T. Degradation of pectins. In: Microbial degradation of natural products, G. Winkelmann, (Ed.), p. 57-81, VCH, Weinheim, New York, Germany, USA. 1992.

SANDRI, I. G.; LORENZONI, C. M. T.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT – Food Science and Technology**. v. 51, n. 2, p. 469-475, 2013.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico, Lajeado**. v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. v.60, p.12 -45, 2013.

SIDDIQUI, M. A.; PANDE, V.; ARIF, M. Polygalacturonase production from *Rhizomucor pusillus* isolated from fruit markets of Uttar Pradesh. **African Journal of Microbiology Research**. v.7, n.3, p.252 – 259, 2013.

SIEIRO, C.; FRAGA, B. G.; SEIJAS, J. L.; SILVA, A. F.; VILLA, T.G. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine, Industry. **Food Industrial Processes – Methods and equipments**. p. 418, 2012.

- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOLC, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.44, p.13 – 18, 2009.
- SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.9, p.987 – 992, 2010.
- Swain MR, Ray RC (2010) Production, characterization and application of a thermostable exopolygalacturonase by *Bacillus subtilis* CM5. **Food Biotechnol**. v.24, p.37 – 50, 2010.
- 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 – 871, 2010.
- TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**. v.21, n.2, p.447 – 453, 2014.
- TASKIN, M. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.36, n.2, p.165 – 172, 2013.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para a produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n.3, p. 509 - 515, 2006.
- VASANTHI MEENAKSHISUNDARAM. Optimization of pectinase enzyme production by using sour orange peel as substrate in solid state fermentation. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**. v.2, n.1, p.16 – 26, 2012.
- VILLENA, M. A.; FERNANDEZ, M.; LOPEZ, J.; BRIONES, A. Pectinases yeast production using grape skin as carbon source. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. v.2, p. 89 – 96, 2011.
- VIVEK, R. RAJASEKHARAN, M.; RAVICHANDRAN, R.; SRIGANESH, K.; VAITHEESWARAN, V. Pectinase production from Orange peel extract and dried Orange peel solid as substrates using *Aspergillus niger*. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**. v.6, p. 445 – 453, 2010.

3.0 Objetivos

3.1 Geral

Otimização das condições de cultura para a produção de enzimas pectinolíticas por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de resíduo de farinha de maracujá e aplicação para a extração de suco de polpa de cupuaçu.

3.2 Específicos

i) otimizar a produção de enzimas pectinolíticas por linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de farinha de resíduo de maracujá (FRM), por planejamento experimental sequencial multivariável;

ii) realizar a caracterização bioquímica parcial do extrato bruto enzimático obtido em condições otimizadas de cultivo;

iii) Aplicar o extrato bruto enzimático, otimizando a extração do suco da polpa de cupuaçu, por meio da metodologia de superfície de resposta;

vi) avaliar o efeito do tratamento enzimático nas características físicas e físico-químicas do suco.

Otimização estatística multivariável da produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de farinha de resíduo de maracujá

Márcia Corrêa de Carvalho^a, Cristiane Rodrigues Silva^a, Ana Paula Trovatti Uetanabaro^b, Andrea Miura da Costa^c, Ana Elizabeth Cavalcante Fai^c, Maria Gabriela Bello Koblitz^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), Escola de Nutrição – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^bDepartamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^cAgroindústria - Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA., Brasil

*e-mail: maria.koblitz@unirio.br

Resumo

O presente estudo visou otimizar a produção de enzimas pectinolíticas por *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de farinha de resíduo de maracujá (FRM), por planejamento experimental multivariável, bem como caracterizar o extrato bruto enzimático obtido em condições otimizadas de cultivo. Primeiramente, um *screening* do tipo 2^{n-1} foi realizado, para avaliar o efeito da agitação, temperatura, pH, bem como concentração de FRM e peptona na atividade pectinolítica total. Este desenho experimental revelou que, com exceção do pH, todas as variáveis eram estatisticamente significativas na faixa de estudo verificada. Em seguida, foram realizados dois delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR) em regime de incubação estático. As variáveis independentes selecionadas para o primeiro DCCR foram temperatura, concentração de FRM e peptona, enquanto no segundo foram temperatura e concentração de FRM, sendo a resposta, em ambos os casos, a atividade pectinolítica total. Para cada planejamento as faixas de estudo foram ajustadas de acordo com os ensaios pretéritos, configurando uma estratégia sequencial de otimização. Sob as condições otimizadas e validadas, a partir de 50% de FRM (p/v), a 30°C por 24h, foi determinada atividade pectinolítica total de 7,066 U/mL, bem como atividade de poligalacturonase, pectina metil esterase, pectina liase e pectatoliase de 3,48; 0,079; 3,07 e 0,8 U/mL, respectivamente. Dentro do nosso conhecimento, este é o primeiro relato de pectato liase produzida por *S.cerevisiae*. O extrato bruto enzimático mostrou atividade ótima em valores de pH variando de 2,0 a 5,0 e em temperaturas de 30, 40, 60, 70 e 80°C. Esse extrato bruto manteve mais de 70% de sua atividade em toda a faixa de pH testada e mais de 80% de sua estabilidade na

faixa de temperatura testada. O estudo realizado validou a hipótese do aproveitamento do resíduo agroindustrial de maracujá para a produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae*, sendo este um processo de valor agregado e com significativo potencial de aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Levedura; Fermentação sólida; Extrato bruto enzimático; Metodologia de superfície de resposta

1. INTRODUÇÃO

Pectinases constituem um grupo heterogêneo de enzimas caracterizadas por degradarem substâncias pécticas, clivando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica e, desta forma, modificando a estrutura da parede celular de vegetais superiores. Destaca-se que substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas, que constituem a maior parte da lamela média, se apresentando como uma delgada camada de material adesivo entre as paredes primárias de células vegetais. Quimicamente, as substâncias pécticas podem ser definidas como um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos majoritariamente formados por resíduos de ácido galacturônico e, ao contrário de outras macromoléculas, não apresentam massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa (HEERD et al., 2012).

Dentre as várias enzimas comercialmente importantes para a indústria, as pectinases se destacam por sua especificidade frente a um aumento de demanda e potencial de expansão de aplicação na manufatura de produtos do setor agroindustrial. Esta constatação é especialmente importante no Brasil, onde este segmento tem um papel proeminente de geração de riqueza para o País, ocupando posições importantes no ranking mundial de produção e exportação de produtos elaborados por este setor. As enzimas pécticas são aplicadas em uma vasta gama de processos na indústria de alimentos, tais como: extração e clarificação de sucos de frutas; tratamento preliminar da uva para produção de vinho; maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais para a fabricação de óleos a partir de sementes/frutas oleaginosas; aceleração do processo de fermentação de chá, café e cacau; auxílio na redução de amargor excessivo em cascas de citrus, entre outros (SIEIRO et al., 2012; GARG et al., 2016). Além destas aplicações, as enzimas pécticas são utilizadas como aditivo em ração animal e são fundamentais no processamento do algodão e na degomagem de fibras naturais para as indústrias têxtil e de papel. Fica evidente, assim, a importância da produção de enzimas pectinolíticas, essenciais para o processamento e transformação de diversos produtos de origem vegetal, na indústria de alimentos e de outros setores (WILLATS et al., 2006).

Estas enzimas podem ser extraídas de vegetais ou produzidas por microrganismos, sendo a última alternativa bastante interessante, apresentando vantagens como: biossíntese orientada de pectinases com atividade catalítica específica, produção em larga escala permitindo otimização do rendimento, da produtividade e da atividade das enzimas sintetizadas, independência dos fatores de sazonalidade, entre outras (LI E BORODINA, 2015; ALIMARDANI-THEUIL, GAINVORS-CLAISSE E DUCHIRON, 2011). Diversos

gêneros de bactérias, fungos filamentosos e leveduras vêm sendo utilizados para a produção de enzimas pectinolíticas (GARG et al., 2016; ANISA E GIRISH, 2014). O emprego de leveduras com este propósito tem chamado atenção nos últimos anos como resposta à plasticidade bioquímica, à facilidade de cultivo e manipulação e à diversidade de pectinases passíveis de produção por este grupo microbiano (ALIMARDANI-THEUIL, GAINVORS-CLAISSE E DUCHIRON, 2011; BELDA et al., 2016). Dentre os gêneros de leveduras referidas na literatura para este fim citam-se: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorola*, *Aureobasidium*, *Candida* e *Metschnikowia* (BELDA et al., 2016; PONDLA et al., 2015). Segundo Pondla et al. (2015) são relatados três tipos de enzimas pectinolíticas secretadas por *Saccharomyces cerevisiae*: pectina liase, poligalacturonase e pectina metil esterase, sugerindo que essa espécie é interessante para a produção de pectinases, apresentando potencial de aplicação nos mais variados setores da indústria de alimentos, entre outras. Neste sentido, a produção de enzimas pectinolíticas por *S. cerevisiae* tem sido alvo de estudos nos últimos anos, com o objetivo de estabelecer processos fermentativos otimizados, econômicos e sustentáveis.

Uma alternativa interessante para alcançar o desafio posto é a utilização da fermentação em estado sólido, que garante maior economia de processo quando comparada ao processo de fermentação submersa (GUPTA et al., 2008). Em adição, a fermentação em estado sólido costuma resultar em concentrações superiores de enzima e permite a utilização de meios de cultivo de baixo custo, tais como os resíduos agroindustriais, de forma eficiente, tornando a produção de enzimas viável, minimizando o impacto ambiental e agregando valor ao resíduo utilizado (HEERD et al., 2012; PRAVEEN E SUNEETHA, 2014). Dentre os resíduos utilizados como substrato alternativo para a produção de pectinase relatados na literatura encontra-se farelo de trigo, casca de banana, casca de limão, casca de laranja, polpa de maçã, cabeças de girassol sem sementes, bagaço de cana e polpa de café (HEERD et al., 2012).

Considerando o acima exposto, este estudo teve como objetivo otimizar a produção de enzimas pectinolíticas por linhagem de *S. cerevisiae*, a partir FRM, por planejamentos experimentais multivariáveis sequenciais, bem como caracterizar o extrato bruto enzimático obtido em condições de cultivo otimizadas e validadas.

2.METODOLOGIA

2.1 MICRORGANISMO

Foram gentilmente cedidas leveduras pertencentes à Coleção de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB), isoladas em dornas de fermentação de cachaça e identificadas como *S. cerevisiae*, previamente selecionadas como possíveis secretoras de pectinases. Dentre as cepas testadas, a de maior potencial secretor de pectinases foi selecionada para os ensaios de otimização do processo, sendo esta cultura mantida em microtubos contendo 80% de solução salina (NaCl a 85%) e 20% de glicerol estéril e estocadas -80°C em ultrafreezer (Indrel, IULT 335 D, Brasil).

2.2 ESTRATÉGIA SEQUENCIAL DE PLANEJAMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

2.2.1 Meio de cultivo

Como meio de cultivo alternativo utilizou-se FRM em concentrações variadas, peptona e água destilada (pH 7,0) ou tampão (pH 5,0, 7,0 e 9,0), de acordo com o delineamento experimental (Tabela 1). A partir da levedura selecionada, foi preparada uma suspensão padronizada, utilizando-se como parâmetro a turbidez determinada por absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 2700, Japão) a 600 nm. As suspensões foram preparadas assepticamente, a partir da cultura *overnight* em meio Ágar Sabouraud, e progressivamente ajustadas com solução salina à absorvância de 0,7 u.a, valor este correspondente a 10^8 células. mL⁻¹ (BARBOSA, 2013). Em cada ensaio foi inoculado 0,1 mL.g⁻¹ de suspensão celular padronizada e os experimentos foram mantidos em incubadora rotatória (Nova Técnica, Incubadora Shaker Refrigerada NT 715, Brasil) sob rotação e temperatura controlada, de acordo com o planejamento utilizado (Tabela 4).

2.2.2 Planejamentos experimentais

Foi utilizada uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais para a otimização da fermentação em estado sólido, visando uma maior secreção de pectinases microbianas, de acordo com Rodrigues e Iemma (2005). Inicialmente, foi realizado um teste fatorial incompleto (2^{n-1}), no qual foram avaliadas cinco variáveis independentes (pH, agitação, temperatura e concentração de peptona e de FRM), em três níveis, a fim de verificar

os efeitos dessas variáveis no meio e na metodologia de cultivo da produção de pectinases. As faixas estudadas foram selecionadas com base na literatura e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis independentes e valores codificados e decodificados utilizados na estratégia sequencial de planejamentos experimentais visando uma maior secreção de pectinases pela levedura

	Variável codificada (nível)	pH	Agitação (rpm)	Peptona (g.100g ⁻¹)	Temperatura (°C)	FRM (g.100g ⁻¹)
Fatorial incompleto	-1	5,0	0,0	0,0	21,0	1,0
	0	7,0	100,0	0,5	28,0	6,0
	+1	9,0	200,0	1,0	35,0	11,0
DCCR 1	- α (-1,68)	-	-	0,0	12,0	4,0
	-1	-	-	0,4	15,2	15,0
	0	-	-	1,0	20,0	28,0
	+1	-	-	1,6	24,7	41,0
	+ α (+ 1,68)	-	-	2,0	28,0	50,0
DCCR2	- α (-1,41)	-	-	-	12,0	4,0
	-1	-	-	-	15,5	12,0
	0	-	-	-	24,0	32,0
	+1	-	-	-	32,5	52,0
	+ α (+ 1,41)	-	-	-	52,0	60,0

Uma vez determinadas as variáveis significativas ($p < 0,05$), foram realizados dois delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR) em sequência, com três variáveis (temperatura e concentração de peptona e de FRM) e duas variáveis independentes (temperatura e concentração FRM), respectivamente (Tabela 4). A variável dependente analisada (resposta) em todos os planejamentos foi a atividade pectinolítica total (U/mL),

determinada conforme detalhado no item 2.4. A análise dos dados dos delineamentos experimentais foi realizada utilizando o software STATISTICA (versão 7.0).

Após a realização dos ensaios propostos pela estratégia sequencial de planejamentos o processo foi validado a fim de verificar a adequação do modelo. Para tanto, experimentos independentes foram realizados, em triplicata, nas condições otimizadas. Os valores previstos matematicamente pela equação gerada no DCCR2 foram comparados aos obtidos experimentalmente na validação do processo utilizando o teste t de Student ($p < 0,05$).

2.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A extração do extrato bruto enzimático foi realizada adicionando-se 0,5 mL de água destilada por g de meio de fermentação para o planejamento fatorial incompleto, e 1 mL de solução tampão acetato (0,2M, pH 5,0) por g de meio de cultivo para o DCCR 1 e 2. O meio de cultivo foi centrifugado (centrífuga Heraeus Megafuge, 16 R, Canadá) a 4°C, 3500 x g, durante 15 minutos, para a precipitação da massa celular, e o sobrenadante foi denominado extrato bruto enzimático, aliquotado e armazenado sob congelamento (-20°C).

2.4 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA TOTAL

O meio reacional foi composto por 150 µL de solução de pectina cítrica (0,5 %) como substrato, 150 µL de água destilada e 300 µL do complexo enzimático, de acordo com Biz et al. (2014) adaptado. A reação ocorreu a 35 °C, durante 7 minutos e foi paralisada pela adição de ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS), solução também utilizada para quantificar os ácidos urônicos redutores liberados pela atividade enzimática, método proposto originalmente por Miller (1959), utilizando ácido monogalacturônico como padrão, em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 2700, Japão), a 540 nm. Uma unidade de pectinase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido monogalacturônico por minuto, por mL, calculada de acordo com a Equação 1 (UENOJO E PASTORE, 2006):

$$([A.M] * V_r) / (V_{\text{extrato enzimático}} * t * MM) = U/mL [1]$$

Onde,

[A.M] = concentração de açúcar redutor (mg/mL);

V_r = volume da reação (mL);

$V_{\text{extrato enzimático}}$ = volume de extrato bruto enzimático (mL);

t = tempo da reação (minutos);

MM = massa molecular do açúcar redutor (mg/ μ mol).

2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

2.5.1 pH e temperatura ótimos

Para avaliação da influência do pH e da temperatura na atividade pectinolítica total, utilizou-se a metodologia adaptada de Cordeiro e Martins, (2009). Para avaliação do pH ótimo, variou-se o pH do meio entre 2.0 a 8.0 (pH 2 tampão hidróclorido de potássio, pH 3 glicina, pH 3,6 a 5 acetato de sódio e pH 6 a 8 fosfato de sódio, todos em concentração 0,2M). O meio reacional continha 150 μ L de pectina cítrica (0,5 %), 150 μ L de tampão e 300 μ L do extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada a 35 °C durante 7 minutos. A temperatura ótima do extrato bruto enzimático foi aferida através da incubação do meio reacional, descrito acima, com o pH ótimo, previamente selecionado, em temperaturas variando de 20 a 80°C, com intervalos de 10 °C, durante 7 minutos. A reação foi paralisada pela adição do DNS e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o descrito no item 2.4.

2.5.2 pH e temperatura de estabilidade

O efeito do pH e da temperatura na estabilidade do extrato bruto enzimático foi avaliado utilizando a atividade enzimática residual de acordo com Poondla et al. (2015). O pH de estabilidade foi avaliado incubando 300 μ L do extrato bruto enzimático em 150 μ L de tampão variando entre pH 2.0 a 8.0, durante 60 minutos e 12 horas, a 8 °C. Após o tratamento de pH do extrato bruto enzimático, a reação se iniciou pela adição de 150 μ L de pectina cítrica (0,5 %) a 35 °C e durou 7 minutos. A temperatura de estabilidade foi estudada de acordo com a metodologia adaptada de Cordeiro e Martins (2009), incubando o 300 μ L do extrato bruto enzimático em temperaturas variando entre 20 a 80°C, com intervalos de 10 °C, durante 60 minutos. Após o tratamento térmico, a reação se iniciou pela adição de 150 μ L de pectina cítrica (0,5 %) e ocorreu no pH ótimo (150 μ L de tampão), durante 7 minutos, a 35 °C. A reação foi paralisada pela adição de DNS. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito em 2.4.

Os ensaios referentes à caracterização bioquímica parcial do complexo enzimático foram efetuados em triplicata e avaliados por análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey-Kramer, de comparação múltipla, com nível de significância de 95%.

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

2.6.1 Atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi determinada conforme a metodologia de Heerd et al. (2012) e Poondla et al. (2015) adaptada. Foram incubados 150 µL de ácido poligalacturônico (1 %), 150 µL de tampão acetato (0,2M, pH 5,0) e 300 µL de extrato bruto enzimático, a reação ocorreu a 45 °C, durante 7 minutos e foi paralisada pela adição de DNS. A atividade enzimática foi mensurada pela quantidade de ácidos urônicos redutores liberados após reação, pelo método adaptado de Miller (1959). Uma unidade de poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido monogalacturônico por minuto, por mL (POONDLA et al., 2015). A atividade de PG foi calculada de acordo com a Equação 1.

2.6.2 Atividade de pectina metil esterase (PME)

A determinação da atividade de PME foi feita de acordo com Heerd et al. (2012). A mistura foi composta por 400 µL do extrato bruto enzimático, 1,0 mL de uma solução de pectina cítrica (0,5 %), 150 µL de azul de bromotimol (0,01 %) e 200 µL de NaCl (1 M). Todos reagentes foram preparados em tampão fosfato (0,2M, pH 7,5). O meio reacional foi incubado em banho maria a 45°C, durante 7 minutos e a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 440 nm e comparada com uma curva de calibração de ácido monogalacturônico. Definiu-se uma unidade de PME como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido monogalacturônico por minuto, por mL. A atividade de PME foi calculada de acordo com a Equação 1.

2.6.3 Atividade de pectina liase (PL)

A atividade de PL foi determinada de acordo com procedimento adaptado de Albersheim e Killias (1962). A reação foi composta por 900 µL de pectina cítrica (0,5%) em tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 100 µL do extrato bruto enzimático. O ensaio foi realizado durante 7 minutos a 45°C. A atividade foi aferida por absorvância em espectrofotômetro a 235

nm (COUTO, 2008). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância do meio em 0,001 u.a por minuto por mL.

2.6.4 Atividade de pectatoliase (PTL)

A atividade de PTL foi determinada de acordo com o procedimento adaptado de Albersheim e Killias (1962). A reação foi composta por 900 µL de ácido poligalacturônico (0,5 %) em tampão acetato (0,2 M, pH 5,0) e 100 µL do extrato bruto enzimático. O ensaio foi realizado durante 7 minutos a 45 °C. A atividade foi aferida em espectrofotômetro a 235 nm (COUTO, 2008). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância do meio em 0,001 u.a por minuto por mL.

2.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. MICRORGANISMOS

Células vegetais e animais são fontes de enzimas, porém, do ponto de vista econômico e industrial, as enzimas extracelulares de microrganismos são preferíveis devido ao seu menor custo de extração, isolamento e purificação (OLIVEIRA, 2007).

Dentre os microrganismos capazes de sintetizar as enzimas pectinolíticas estão bactérias, fungos e leveduras. Preparações comerciais de pectinases são normalmente obtidas de fungos filamentosos: *Aspergillus* (*A. niger*, *A. wentii*, *A. oryzae*) e *Rhizopus* (HEERD et al., 2012 e POODLA et al., 2015), porém várias espécies de leveduras também são capazes de produzir estas enzimas, tais como as leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Stephanoascus*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pseudozyma*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Kloeckera*, *Ambrosiozyma*, *Bullera*, *Geotrichum*, *Rhodospiridium*, *Saccharomycopsis* e *Ustilago* (OLIVEIRA, 2007). Enzimas pécticas produzidas por leveduras constituem uma fonte alternativa para a produção de enzimas comerciais. As leveduras possuem propriedades peculiares e vantajosas: sua natureza é unicelular e seu crescimento ocorre em meios simples, sendo assim, são capazes de se desenvolver em distintos substratos (BARRETO, 2012; HEERD et al., 2012).

Poondla et al. (2015), avaliando 5 cepas distintas de leveduras, identificaram a estirpe de *S. cerevisiae* como a de maior produção de pectinases e detectaram a presença de PL e PG,

Gaivors et al. (1994) e Couto (2008) detectaram a presença de PG, PME e PL produzidas por *S. cerevisiae*. As diversas enzimas produzidas por cepas dessa espécie de levedura fazem com que ela possua um papel importante na indústria de alimentos, destacando-se como a espécie de levedura mais explorada comercialmente (NEVES, 2003; POONDLA et al., 2015).

3.2. PLANEJAMENTOS SEQUENCIAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA TOTAL POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

A exploração de enzimas depende sobretudo do custo de sua produção em escala industrial. A produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular pela composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH, temperatura de incubação e agitação (NEVES, 2003; CORDEIRO E MARTINS, 2009). No presente trabalho investigou-se a possibilidade de se obter enzimas pectinolíticas a partir de *S. cerevisiae*, usando resíduo agroindustrial como substrato, de modo a reduzir os custos de processo. A fermentação em estado sólido geralmente é preferida dentre as outras formas de fermentação, por permitir a produção de extratos enzimáticos brutos mais concentrados, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação (BASTOS, 2010; SOUZA et al., 2010). Porém a fermentação em estado sólido dificulta o controle de diversos parâmetros do processo, em virtude da heterogeneidade das condições de fermentação (PEDROLLI et al., 2009).

A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados para cada fermentação particularmente, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para a obtenção de diferentes enzimas (BASTOS, 2010). Sendo assim, para avaliar as variáveis significativas, foram realizados os ensaios determinados pelo planejamento fatorial incompleto, descrito na Tabela 5, tendo como resposta a atividade pectinolítica total em U/mL.

Tabela 5. Delineamento experimental fatorial incompleto para seleção das variáveis que afetam significativamente a secreção de pectinases

Ensaio	% FRM	pH	Temperatura	Agitação	% Peptona	U/mL
1	1	5	21	0	1	0,849
2	11	5	21	0	0	1,935
3	1	9	21	0	0	0,496
4	11	9	21	0	1	2,351
5	1	5	35	0	0	0,488
6	11	5	35	0	1	2,213
7	1	9	35	0	1	0,772
8	11	9	35	0	0	1,632
9	1	5	35	200	0	0,493
10	11	5	21	200	1	1,729
11	1	9	21	200	1	0,838
12	11	9	21	200	0	1,923
13	1	5	21	200	1	0,562
14	11	5	35	200	0	0,858
15	1	9	35	200	0	0,392
16	11	9	35	200	1	0,702
17	6	7	28	100	0,5	1,315
18	6	7	28	100	0,5	1,116
19	6	7	28	100	0,5	1,154
20	6	7	28	100	0,5	1,036

A partir dos resultados para atividade pectinolítica total o programa STATISTICA (7.0) forneceu o gráfico de Pareto (Figura 4), no qual se observam as variáveis significativas ($p < 0,05$).

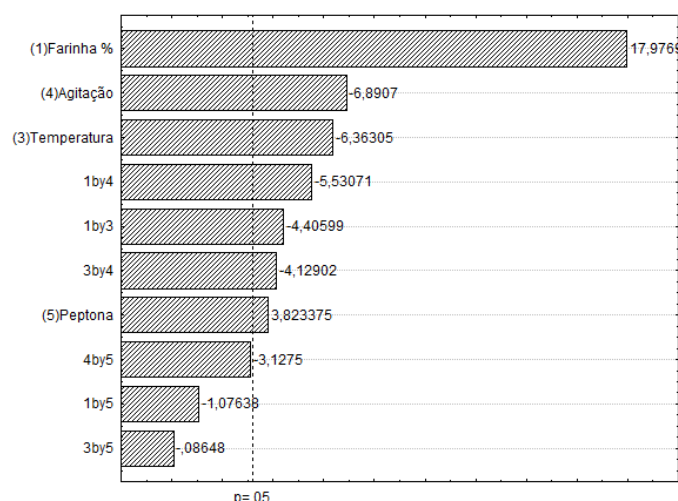


Figura 4. Gráfico de Pareto dos experimentos referentes ao delineamento experimental fatorial incompleto.

Através do gráfico de Pareto foi possível analisar as variáveis significativas para o modelo e avaliar sua tendência. O valor da probabilidade (p) é um indicador de significância da variável teste e valores menores que 0,05 indicam que a variável é significativa, com 95% de probabilidade (ZHANG et al., 2009). O sinal positivo (+) do fator da variável independente no gráfico de Pareto indica que o aumento do seu valor conduz a um aumento na variável dependente (atividade enzimática), enquanto que o sinal negativo (-) indica que um aumento no seu valor conduz a uma diminuição nessa atividade (POONDLA et al., 2016).

Observa-se que a variável pH não foi significativa, isto é, o valor de pH do meio de cultivo não alterou a resposta em U/mL. O pH é uma importante variável a ser considerada em um cultivo de microrganismos, pois cada cepa possui um valor ótimo de pH, no qual deverá ser cultivada para maior crescimento. No entanto, os microrganismos tem uma eficiente capacidade tamponante intracelular, mantendo o valor de pH ótimo, portanto, o pH utilizado no cultivo afeta sobretudo as enzimas secretadas (NEVES, 2003). Assim, para o delineamento experimental subsequente, a variável independente pH foi fixada em pH = 5, uma vez que, segundo Biz et al. (2014) e Poondla et al. (2015), a produção de pectinases por leveduras é máxima em pH em torno de 4,5 a 6,5. Além disso, verificou-se que Martos et al. (2012) avaliaram PG produzida pela levedura *Wickerhamomy cesanomalus* que apresentou pH ótimo em 4,5; Jayani et al (2005) analisaram que pectinases de *S. cerevisiae* que apresentaram pH ótimo de atividade de 5,5.

O teor de peptona apresentou baixa influência na resposta, a menor dentre as variáveis significativas. Villena et al. (2011), comparando a secreção de PG por *Aspergillus niger*, encontraram maior atividade pectinolítica em meios contendo peptona como fonte de nitrogênio, após 46h de fermentação. Bastos (2010) e Cordeiro e Martins (2009) concluíram que suplementando o meio com nitrogênio, respectivamente extrato de levedura ou peptona e peptona ou citrato de amônio e uréia, níveis mais altos de atividade enzimática foram encontrados e altos níveis de biomassa foram produzidos, sugerindo que, para a produção de enzimas em larga escala, a fonte de nitrogênio é uma importante variável. Villena et al. (2011) mostraram a produção aumentada de pectinases por *S. cerevisiae*, em meio com suplementação de peptona. Para melhor avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com peptona na secreção de pectinases pela cepa de *S. cerevisiae* testada, com base na literatura e nos resultados experimentais obtidos até aqui, no delineamento experimental seguinte o teor máximo testado foi duplicado (2% de peptona).

Todo microrganismo possui uma temperatura ótima de crescimento, quanto mais próxima desse ótimo for a temperatura de cultivo, mais aceleradas serão as reações químicas e enzimáticas nas células e mais rapidamente ocorrerá a multiplicação celular. Porém, se o aumento ultrapassar a temperatura máxima suportada pelos microrganismos, ocorrerá sua morte, efeito este que será mais evidente quanto maior for o tempo de exposição a essa temperatura. As leveduras, em geral, possuem temperaturas ótimas na faixa de 25 a 35°C (NEVES, 2003). Souza et al. (2010) determinaram a faixa de temperatura ideal para fermentação de *S. cerevisiae* entre 28 a 30°C. Poondla et al. (2015) mostraram que a atividade de pectinases foi máxima em fermentação a 30 °C e que a atividade foi aumentada com a elevação da temperatura entre 4 a 30°C, mas houve redução em temperaturas mais elevadas, de 35 a 45°C. Sendo assim, a temperatura foi uma variável testada no planejamento fatorial incompleto entre os valores de 21 a 35°C, a fim de avaliar sua influência na secreção de pectinases. Os resultados confirmaram que a temperatura foi uma variável significativa indicando que menores temperaturas foram melhores para obter maiores atividades enzimáticas, no intervalo avaliado. Dessa forma, no delineamento experimental seguinte foi testado um intervalo de temperatura incluindo valores mais baixos, de até 12°C.

A agitação é considerada um importante recurso a ser utilizado na fermentação, proporcionando melhores condições de crescimento por levar à homogeneização do meio de cultivo (NEVES, 2003). No presente estudo, a agitação foi considerada significativa, no entanto, os níveis mais baixos entre os testados foram os sugeridos para se obter maior atividade enzimática e, portanto, fixou-se a incubação em regime estático.

Buscando formulações de meios de baixo custo, determinou-se a FRM como um bom recurso a ser utilizado para a produção de pectinases, atuando como fonte de carbono e energia para dar suporte ao crescimento microbiano (SOUZA et al., 2010). O meio de cultivo testado foi composto sobretudo de FRM e água/ou tampão. De acordo com Cordeiro e Martins (2009), a atividade de pectinases deve ser significativamente maior durante o crescimento de microrganismos em meio contendo pectina, quando comparados a açúcares simples. O teor de pectina em alguns resíduos agroindustriais em g/100g de matéria úmida são: maçã 0,5-1,6; caqui 0,6; polpa de beterraba 1,0; laranja 4,0; morango 0,6-0,7; tomate 0,2-0,6; uva 0,2-1,0; maracujá 15-40 (SANTI, 2014), indicando que a farinha de maracujá possui elevado conteúdo de pectina. No presente estudo, o teor de farinha foi a variável que mais alterou a atividade enzimática e os resultados indicaram que, quanto maior o teor de farinha

no meio de cultivo, maior a atividade pectinolítica. Inicialmente foram testados teores de farinha não superiores a 11%, visando obter um meio líquido de fácil homogeneização. Entretanto, em virtude dos resultados obtidos, tanto para a variável “% FRM” quanto para a variável “agitação”, e considerando as vantagens envolvidas na aplicação de meios de cultivo mais concentrados (sólidos), no delineamento seguinte foram testados teores de farinha de até 50%, produzindo meios de cultivo sólidos.

A Tabela 6 apresenta o delineamento experimental DCCR1.

Tabela 6. Matriz do delineamento composto central rotacional e resposta em atividade pectinolítica total, após 24 h de fermentação por *S. cerevisiae*

Ensaio	% FRM	Temperatura	% Peptona	U/mL
1	15	15	0,4	0,915
2	15	15	1,6	0,304
3	15	24,7	0,4	0,379
4	15	24,7	1,6	0,253
5	41	15	0,4	4,050
6	41	15	1,6	2,079
7	41	24,7	0,4	4,583
8	41	24,7	1,6	5,626
9	4	20	0,4	0,921
10	50	20	1	0,886
11	28	12	1	1,190
12	28	28	1	6,050
13	28	20	2	0,868
14	28	20	0	1,126
15	28	20	1	2,119
16	28	20	1	1,587
17	28	20	1	2,138

Pela observação da Tabela 6 verifica-se que o maior valor de atividade pectinolítica total atingido foi de 6,05 U/mL com temperatura de 28 °C, 28 % de FRM e 1% de peptona, seguido de 5,63 U/mL em 24,7°C, 41 % de FRM e 1,6% de peptona, um aumento significativo em relação ao maior valor obtido no experimento anterior, de 2,351 U/mL.

Jaramillo (2014) determinou a atividade de pectinase produzida por *Aspergillus niger* em fermentação líquida a 28 °C, utilizando 1 % de casca de maracujá amarelo como fonte de carbono. A atividade alcançada foi de 0,24 U/mL, proporcional ao obtido no presente estudo no qual, quando se utilizou 4 % de farinha de maracujá (ensaio 9), obteve-se o valor de 0,92 U/mL.

As Figuras 5 e 6 apresentam a influência das variáveis dependentes e as interações entre elas na atividade enzimática. Na Figura 5 observa-se que temperaturas maiores do que 24 °C e temperaturas menores que 17 °C levaram à maior secreção de pectinases. No entanto, quando leva-se em consideração o efeito do teor FRM no meio de cultivo, verifica-se que maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando foram combinadas temperaturas maiores que 26 °C e teores de FRM superiores a 45%. Pela observação da Figura 6, verifica-se que o teor de peptona, dentro do intervalo testado, não apresentou influência significativa: independente do valor utilizado não foi verificada alteração na resposta. Possivelmente, a utilização de uma maior proporção FRM garantiu as quantidades requeridas de nitrogênio para secreção da enzima e desenvolvimento celular, tornando a suplementação com peptona desnecessária. Considerando-se a provável diferença de custo entre a farinha de maracujá, resíduo da indústria de sucos, e a peptona, foi preferível aumentar o teor da primeira e eliminar o uso da segunda.

Verificou-se, portanto, que a secreção de pectinases por *S. cerevisiae* foi influenciada de forma linear (mas não quadrática) pela FRM do meio e de forma quadrática pela temperatura de cultivo. Esses resultados sugerem que um teor de farinha maior e temperaturas mais elevadas do que a faixa testada, provocariam uma atividade pectinolítica mais elevada, o que pode ser inferido pela observação da Figura 5.

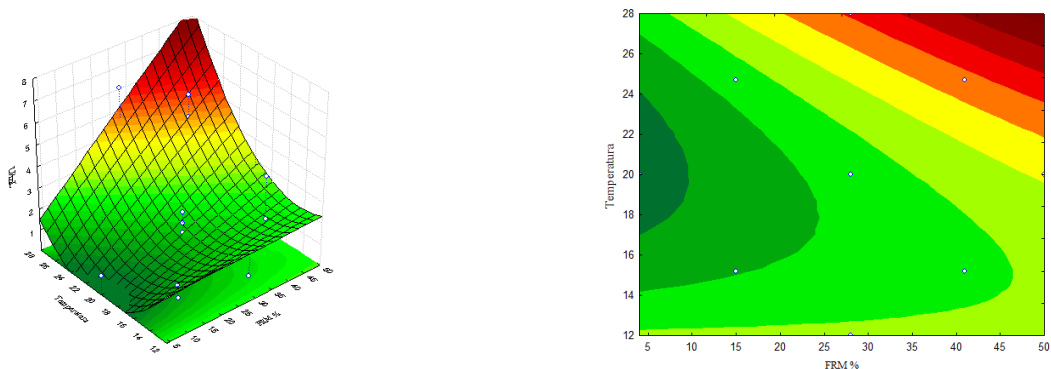


Figura 5. Influência das variáveis “temperatura de cultivo (°C)” e “teor de farinha de maracujá (%)” na secreção da atividade pectinolítica total por *S. cerevisiae*. A) Curva de contorno e B) Superfície de resposta.

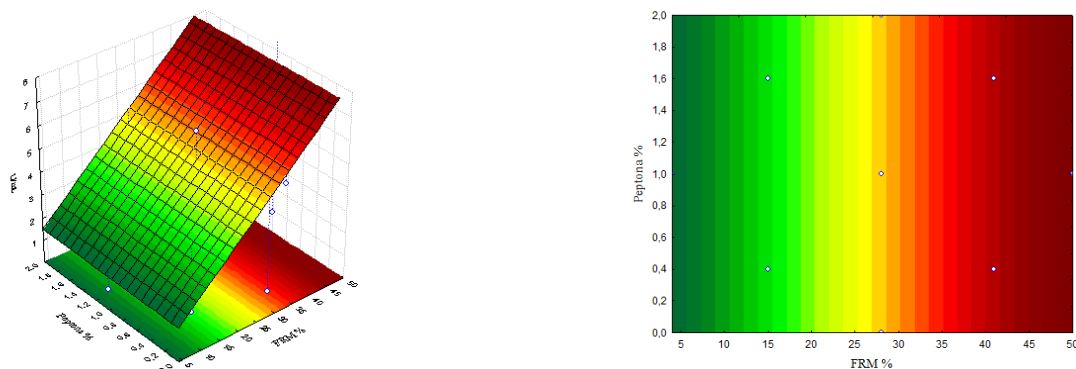


Figura 6. Influência das variáveis “teor de peptona (%)” e “teor de farinha de maracujá (%)” na secreção da atividade pectinolítica total por *S. cerevisiae*. A) Curva de contorno e B) Superfície de resposta.

Com o objetivo de otimizar as variáveis de maior influência e verificar um possível aumento na secreção da atividade pectinolítica total, foi elaborado um terceiro delineamento experimental (DCCR2), onde foram aperfeiçoados as variáveis e os níveis de variação: a variável teor de peptona foi eliminada e uma faixa de temperatura mais elevada e maior teor de farinha foram testados. Na Tabela 7, encontra-se o delineamento experimental referente ao DCCR2.

Tabela 7. Matriz do delineamento composto central rotacional 2, resposta em atividade pectinolítica total e resultados preditos pela equação descritiva do modelo, após 24 h de fermentação por *S. cerevisiae*

Ensaio	% FRM	Temperatura	U/mL (Observado)	U/mL (Predito)
1	12	15,5	0,865	0,974
2	12	32,5	0,799	0
3	52	15,5	0,865	1,903
4	52	32,5	5,259	5,217
5	4	24	0,306	0,936
6	60	24	6,057	5,359
7	32	12	0,865	0,067
8	32	36	0,865	1,597
9	32	24	4,421	3,593
10	32	24	3,696	3,593
11	32	24	2,66	3,593

Uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 2) foi utilizada para correlacionar as variáveis independentes “teor de farinha de maracujá (f, em %)” e “temperatura de cultivo (t, em °C)” com a variável independente “atividade pectinolítica total (U/mL)” e para gerar os valores de atividade preditos observados na Tabela 7.

$$U/mL = -7,054 - 0,04*f - 0,0006*f^2 + 0,77*t - 0,02*t^2 + 0,007*f*t \quad [2]$$

A partir da análise de variância (ANOVA) do modelo de superfície de resposta, determinou-se o valor de F calculado (11,54), um valor 2,5 vezes maior do que o F tabelado. Isso confere ao modelo uma alta significância, que pode ser notada na baixa variabilidade entre os valores observados e preditos. A qualidade do ajuste do modelo de regressão foi testada avaliando o coeficiente de determinação com base em r^2 . O modelo do DCCR 2 apresentou um elevado coeficiente de regressão, que explica 87% da variabilidade da resposta. O valor do coeficiente de determinação ajustado ($Adj\ r^2 = 0,74$) também foi alto, mostrando um bom ajuste entre as respostas observadas e previstas.

Pela observação da Tabela 7, verifica-se que o maior valor de atividade pectinolítica total atingido foi de 6,06 seguido de 5,26 U/mL, respectivamente com temperaturas de 24 e 32,5 °C, teor de farinha 60 e 52 %. Não houve aumento significativo na atividade pectinolítica total obtida, em comparação com o experimento anterior, porém valores similares de atividade foram obtidos pelo aumento do teor de farinha e com eliminação da suplementação com peptona, comprovando o anteriormente mencionado.

Em comparação com a literatura, a atividade enzimática alcançada nesse estudo foi conseguida em menor tempo de incubação do que a relatada em estudos disponíveis com outras estirpes e com outras fontes de resíduo agroindustrial. A atividade enzimática obtida a partir de *S. cerevisiae*, em meio contendo casca de laranja e óleo de amendoim, foi de 6,285 U/mL em 48h (POODLA et al., 2016), Poodla et al. (2015), utilizando caldo de carne como única fonte de nutrientes, atingiu a atividade de 5,91U/mL, por linhagem de *S. cerevisiae*, após 48h de fermentação.

A Figura 7 mostra que não foram observadas diferenças significativas na atividade pectinolítica total quando foram aplicadas proporções de farinha de maracujá entre 50 e 60 % e temperaturas de incubação entre 22,5 e 36 °C, uma grande margem de variação na qual foi garantida uma mesma atividade enzimática. Assim, visando obter a maior atividade pectinolítica total pelo menor custo de produção, usando a presente linhagem de *S. cerevisiae*,

pode-se recomendar a aplicação de meio de cultivo contendo 50% de farinha de maracujá, sem qualquer suplementação, e a fermentação pode ser conduzida em temperatura ambiente, desde que esta não seja inferior a 22°C nem superior a 36°C.

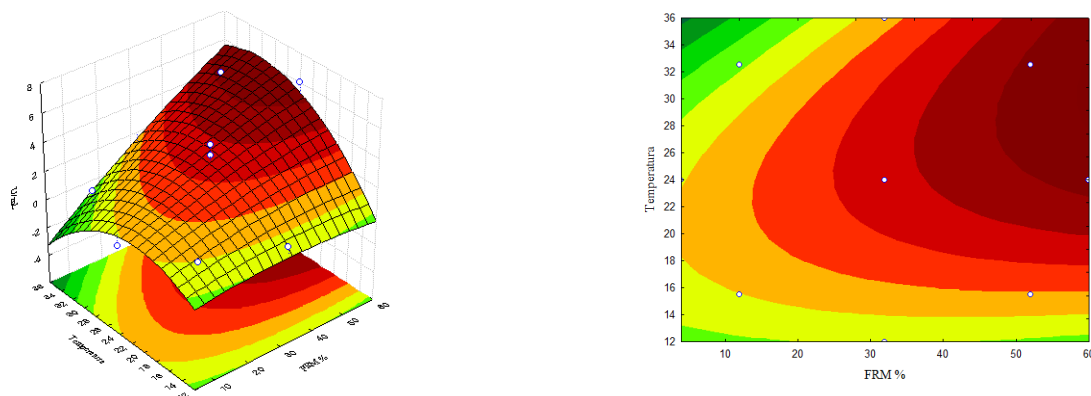


Figura 7. Influência das variáveis “temperatura de cultivo (°C)” e “teor de farinha de maracujá (%)” na secreção da atividade pectinolítica total por *S. cerevisiae*. A) Curva de contorno e B) Superfície de resposta.

Para validar a adequação do modelo, experimentos independentes foram realizados, em triplicata, usando o meio otimizado, com teor de farinha de 50 % e temperatura de incubação de 30 °C. A atividade máxima observada da enzima foi de $7,066 \pm 0,562$ U/mL. Segundo o modelo matemático adquirido a partir do DCCR2, a atividade prevista seria de 5,046 U/mL, sendo verificada diferença significativa entre esses valores pelo teste t de Student, em nível de significância de 95%. A atividade ensaiada com o meio otimizado mostrou um aumento de 3 vezes em relação à maior atividade observada no primeiro experimento (2,351 U/mL).

3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

3.4.1 pH e temperatura ótimos

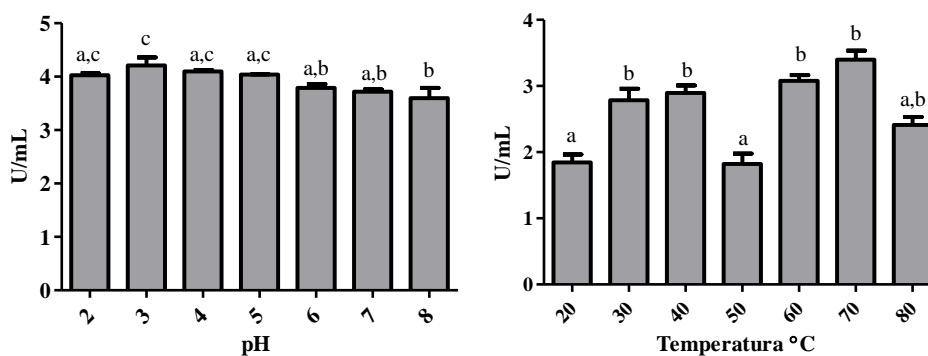


Figura 8. Influência do pH (A) e da temperatura (B) na atividade do extrato bruto pectinolítico

O pH e a temperatura de atividade e estabilidade são características bioquímicas das enzimas que sofrem alterações de acordo com o microrganismo produtor e as condições de produção das enzimas (BISSWANGER, 2014). O pH do meio é uma importante variável de processo, pois alterações no seu valor geralmente influenciam a atividade enzimática, por gerarem modificações conformacionais nas enzimas, proporcionando alterações no seu sítio ativo, o que resulta na redução ou no aumento da sua afinidade com o substrato (Neves, 2003).

No presente estudo, o pH ótimo (Figura 8A), que forneceu a máxima atividade pectinolítica total foi 3,0, sem porém haver diferença significativa entre valores de pH de 2,0 a 5,0. De uma forma geral, a atividade variou pouco na faixa testada, o que sugere que o extrato bruto enzimático é composto de diferentes isoenzimas, tanto de PG quanto de PL, que possuem distintos valores de pH ótimos, garantindo boa atividade pectinolítica total em ampla faixa de pH. Martos et al. (2012) avaliaram PG produzida pela levedura *Wickerhamomyces anomalus*, que apresentou pH ótimo em 4,5, Ezugwu et al. (2012) a partir de *Aspergillus fumigatus* conseguiram maior atividade pectinolítica total em pH 5,5. Masoud e Jespersen (2006) encontraram pH ótimo de atividade da enzima produzida por cepas de *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 e *Penicillium manomala* S16 de 5,5; enquanto para PG produzida por *Penicillium kluyveri* S13Y4 verificou-se atividade máxima em pH 5,0. Os estudos citados anteriormente sugerem que as pectinases apresentam pH ótimo de atuação na faixa ácida, variando de acordo com o microrganismo produtor.

A temperatura ótima do extrato bruto enzimático foi obtida em 70°C (Figura 8B) sem, no entanto, haver diferença significativa nas faixas entre 30 a 40°C e 60 a 80°C. Na literatura são apresentadas temperaturas ótimas para pectinases na faixa de 30-50 °C dependendo do microrganismo produtor. Ezugwu et al. (2012) alcançaram maior atividade pectinolítica produzida por *Aspergillus fumigatus* em 40 °C. Para *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 e *Penicillium anomala* S16 a atividade máxima observada foi de 40 °C e para PG produzida por *Penicillium kluyveri* S13Y4 foi de 50°C. Para as três leveduras, a atividade PG diminuiu rapidamente acima de 50 °C e a enzima foi totalmente inativada a 70 °C (MASOUD E JESPERSEN, 2006). O presente estudo mostrou atividade ótima em temperatura elevada em relação aos estudos da literatura, uma característica vantajosa, pois processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos significativamente reduzidos.

3.4.2 pH e temperatura de estabilidade

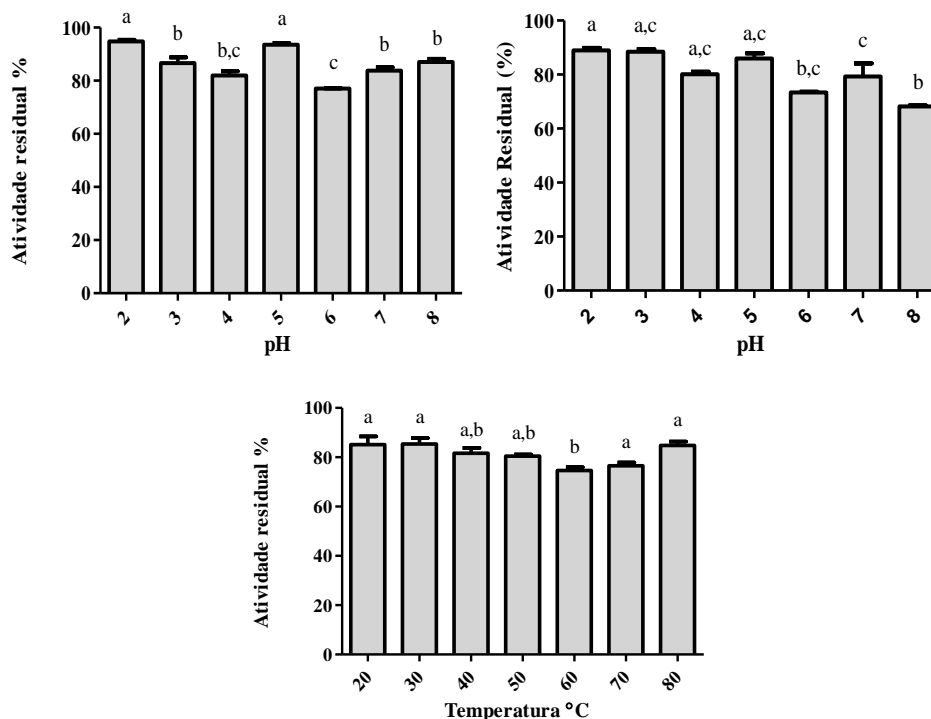


Figura 9. Influência do pH (A) após 60 minutos e (B) após 12 horas e da temperatura (C) na estabilidade do complexo pectinolítico

O pH afeta a estabilidade das enzimas, pois as cadeias laterais de diversos aminoácidos da estrutura molecular das enzimas agem como ácidos ou bases fracos. Assim, quando submetidas a valores extremos de pH, tanto ácidos como básicos, enzimas podem

sofrer desnaturação, inclusive de forma irreversível. No presente estudo, o extrato bruto enzimático produzido em meio otimizado foi mantido em diversos valores de pH por períodos de 1 e de 12 horas (Figura 9 A e B). Em ambos os casos, o extrato bruto enzimático manteve sua atividade pectinolítica total residual superior a 70% da atividade original, indicando excelente estabilidade em uma faixa bastante larga de valores de pH. Esse comportamento pode ser também consequência da presença de múltiplas isoenzimas de PL e PG, cada uma apresentando melhor estabilidade em uma faixa de pH e contribuindo para a manutenção da atividade pectinolítica total. Martos et al. (2012) avaliaram a estabilidade de PG produzida pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* que apresentou pH de estabilidade entre 3,0 - 6,0, Souza et al. (2010) observaram a estabilidade de PG produzida por *Aspergillus niger* em pH de 3,5-5,5, essa enzima foi instável em valores de pH acima de 6,5.

O aumento da temperatura favorece a velocidade das reações, pois proporciona uma maior energia cinética e consequentemente um aumento no número de choques entre as moléculas (enzima e substrato) (NEVES, 2003). No entanto, geralmente, o aumento da temperatura, acima de valores específicos para cada enzima, leva ao aumento da agitação molecular das próprias enzimas, promovendo o rompimento das ligações intramoleculares responsáveis pelas estruturas superiores das proteínas e causando interrupção abrupta da atividade. No presente estudo, o complexo pectinolítico manteve mais de 80% de sua atividade original em toda a faixa testada (exceto a 60°C), após 60 minutos de tratamento térmico (Figura 9C), o que indica alta resistência térmica e garante a possibilidade de utilização das enzimas produzidas em processos conduzidos em temperaturas elevadas (até 80°C) por, pelo menos, uma hora.

Estudos da literatura com outras estirpes mostram uma temperatura de estabilidade menor. Martos et al. (2012) em estudo avaliaram PG produzida pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* que apresentou temperatura de estabilidade entre 40 - 50 °C. A PG produzida por *Aspergillus niger* apresentou 75% da atividade residual até temperaturas de 50 °C, no entanto, foi completamente inativada quando incubada em temperaturas acima de 70 °C, durante 20 minutos (SOUZA et al, 2010). Cordeiro e Martins (2009) obtiveram um resultado próximo ao do presente estudo analisando temperatura de estabilidade de PG produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2, que manteve 70 % de atividade residual até a temperatura de 70 °C.

3.5. ATIVIDADE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Foi avaliada a presença de diferentes enzimas pectinolíticas existentes no extrato bruto enzimático produzido em condições ótimas de fermentação. Poondla et al (2015) detectaram a presença de PL e PME, Gaivors et al. (1994) e Couto (2008) relataram a produção de PG, PME e PL por *S. cerevisiae*.

A PG é a enzima mais comum do grupo das pectinases (COUTO, 2008). No atual estudo, determinou-se a atividade de PG de $3,48 \pm 0,456$ U/mL. Herred et al. (2012) determinaram atividade de 45 U/mL, a partir de cepa de *Aspergillus oryzae*, em meio líquido suplementado com farelo de trigo após 64 h de fermentação. Segundo Gonçalves et al. (2012) a atividade de PG produzida a partir de um meio mínimo por linhagem de *Penicillium griseoroseum* foi de 9,465 U/mL, alcançada em 84 h de fermentação. A atividade alcançada por Biz et al. (2014) foi de 14,5 U/mL, produzida por cepa de *Aspergillus niger* a partir de farelo de trigo em 24 h de fermentação. Nos trabalhos citados acima as pectinases estudadas foram produzidas por diferentes fungos filamentosos, principais produtores comerciais de enzimas pectinolíticas (HERERD et al., 2012).

No presente estudo determinou-se atividade de PME de $0,079 \pm 0,003$ U/mL. Segundo Poondla et al. (2015), a produção de PME por leveduras é normalmente reduzida, ao contrário do que acontece com linhagens de fungos filamentosos. Baixa atividade de PME tem a vantagem de reduzir a liberação de metanol no meio reacional.

O extrato bruto enzimático produzido por *S. cerevisiae* em condições otimizadas apresentou atividade de $3,07 \pm 0,394$ U/mL de PL, correspondendo à segunda maior atividade nesse extrato bruto enzimático. A presença de PL garante a hidrólise de pectina de alto teor de metoxilação, mesmo na completa ausência de PME e, portanto, é esperada que a atividade dessa enzima seja alta em extrato bruto enzimático produzidos por leveduras. De fato, somadas, as atividades de PG e PL representam mais que a totalidade da atividade pectinolítica total produzida, em condições otimizadas, pela linhagem de *S. cerevisiae* testada no presente trabalho. Gonçalves et al. (2012) detectaram atividade de PL de 2,43 U/mL produzida por *Penicillium griseoroseum*, Biz et al. (2014) determinaram atividade de 4,15 U/mL produzida por *Aspergillus niger*, em meio de farelo de trigo

Foi determinada ainda atividade de pectato liase (PTL) de $0,8 \pm 0,026$ U/mL. Até onde sabemos esta é a primeira vez que atividade de PTL é relatada sendo produzida por *S. cerevisiae*.

4. CONCLUSÃO

Diferentes estratégias têm sido propostas nos últimos anos para o aproveitamento de resíduos oriundos da agroindústria. Os resultados observados neste estudo sugerem que a fermentação em estado sólido empregando FRM, constitui-se como uma alternativa viável para a produção de pectinases por *S. cerevisiae*. O método de planejamento multivariável sequencial provou-se uma ferramenta apropriada para estabelecer as condições mais adequadas do processo e otimizar a atividade enzimática. Nesta condição, obteve-se a partir de 50% de FRM (p/v), a 30 °C por 24h, atividade pectinolítica total de 7,066 U/mL, bem como atividade de poligalacturonase, pectina metil esterase, pectina liase e pectatoliase de 3,48; 0,079; 3,07 e 0,8 U/mL, respectivamente. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de pectatoliase secretada por esta levedura. O extrato bruto enzimático formado mostrou atividade ótima em valores de pH variando de 2,0 a 5,0 e em temperaturas de 30, 40, 60, 70 e 80°C. Esse extrato bruto manteve mais de 70% de sua atividade em toda a faixa de pH testada e mais de 80% de sua estabilidade em toda a faixa de temperatura testada. A produção otimizada de diferentes tipos de pectinases de alto valor agregado sugere um amplo potencial de aplicação industrial.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, 560714/2010-6 Edital MCT/CNPq/CT-BIOTEC nº 27 - Rede Nacional de Pesquisa em Leveduras, Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALBERSHEIM, P.; KILLIAS, U. B. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of biochemistry and biophysics**. v. 97, n. 97, p. 107-115, 1962.
- ANISA, S. K.; GIRISH, K. Pectinolytic Activity of *Rhizopus* sp. and *Trichoderma viride*. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**. v.4, n.2, p.28-31, 2014.
- BARBOSA, C. D. **Obtenção e caracterização de vinho e vinagre de manga (*Mangifera indica* L.): parâmetros cinéticos das fermentações alcoólica e acética**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2013.
- BARRETO, L. T. P. **Enzimas pectinolíticas de *kluyveromyces marxianus*: seleção e aplicação em processos da indústria de alimentos**. 2012. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2012.
- BELDA, I.; CONCHILLO, L. B.; RUIZ, J.; NAVASCUÉS, E.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**. v. 223, p. 1-8, 2016.
- BASTOS, S. C. **Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries: condições de cultivo, purificação parcial e caracterização**. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.
- BIZ, A.; FARIAS, F. C.; MOTTER, F. A.; PAULA, D. H.; RICHARD, P.; KRIEGER, A.; MITCHEL, D. A. Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works! **Plos ONE**. v.9, n.10, p. 10, 2014.
- BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**. v.1, n.6, p. 41-55, May 2014.
- CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas Propriedades. **Ciência e tecnologia de Alimentos**. v.29, n.1, p.135-141, 2009.
- COUTO, F. M. M. **Leveduras produtoras de β - glicosidase e pectinase**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em biologia de fungos), Universidade federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2008.
- EZUGWU, A. L.; EZE, S. O. O.; CHILAKA, F. C.; ANYANWU, C. U. Production and characterization of pectinases obtained from *Aspergillus fumigates* in submerged fermentations system using pectin extracted from mango peels as carbon. **Plant Products Research Journal**. v.16, p. 30 - 36, 2012.
- FERNANDEZ, D. E. R.; LEON, J. A. R.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; SOCCOL, C. R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. v.102, n.22, p.10657-10662, 2011.
- GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**. v.10, p.1311-1319. 1994.
- GARG, G. A. S.; KAUR, A. R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotechnology**. v. 6, n.1, p. 47, 2016.

- GUPTA, S.; KAPOOR, M.; SHARMA, K. K.; NAIR, L. M.; RAMESH, C. K. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. **Bioresource Technology**. v. 99, n.5, p. 937-945, 2008.
- HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; LAHORE, M. F. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. In solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**. v. 90, n.2, p. 102-110, 2012.
- JARAMILLO, P. M. D. **Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo**. 2014.165 f. Dissertação (Mestrado em Biologia molecular). Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2014.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review Process Biochemistry. v. 40, n.9, p. 2931–2944, September 2005.
- LI, M.; BORODINA, I. Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**. v.15, p.1–12, 2015.
- MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. **Biotechnology Research International**. p. 7, 2012.
- MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**. v.110, p. 291-296, 2006.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NEVES, L.C.M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando ‘*Saccharomyces cerevisiae*’ W303**. 2003. 181 f. Dissertação (Mestrado EM Tecnologia de fermentações). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. favicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e tecnologia de Alimentos**. v. 22, n.3, p. 259-262, 2007.
- PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMORA, E. G. Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **Biotechnology Journal**. v.3,p.9-18, 2009.
- POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM.R.; OBULAM, A. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4, p. 70-76, 2015.
- POONDLA, V.; YANNAM, S. K.; GUMMADI, S. N.; SUBRAMANYAM, R.; OBULAM, V. S. R. Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 6, p. 40-50, 2016.
- PRAVEEN, K. G.; SUNEETHA V. Natural, Culinary Fruit Peels as a Potential substrate for Pectinolytic Enzyme. **Full Length Original Research Paper**. v. 6, n.3, 2014.

- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** Campinas São Paulo, 5ª Ed. Casa do pão, 2005.
- SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico, Lajeado.** v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.
- SIEIRO, C.; FRAGA, B. G.; SEIJAS, J. L.; SILVA, A. F.; VILLA, T.G. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine, Industry. **Food Industrial Processes, Methods and equipments.** p. 418, 2012.
- SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v.14, n.9, p.987-992, 2010.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para a produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v.26, n.3, 509-515, 2006.
- VILLENA, M. A.; FERNANDEZ, M.; LOPEZ, J.; BRIONES, A. Pectinases yeast production using grapeskin as carbon source. **Advances in Bioscience and Biotechnology.** v.2, p. 89-96 2011.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEM, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology.** v. 17, n.3, p. 97-104, 2006.
- ZHANG, C. H.; Ma, Y. J.; YANG, F. X.; Liu, W.; ZHANG, Y. D. Optimization of medium composition for butyric acid production by *Clostridium thermobutyricum* using response surface methodology. **Bioresource Technology.** v.100, p.4284-4288. 2009.

Aplicação de pectinase de *Saccharomyces cerevisiae* na extração de suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): uma otimização estatística do tratamento enzimático

Márcia Corrêa de Carvalho^a; Ana Elizabeth Cavalcante Fai^b; Maria Gabriela Bello Koblitz^{*a}

^a Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^b Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Corresponding author: Koblitz, M.G.B. E-mail: mkoblitz@gmail.com

Resumo

Pectinases são enzimas que clivam as substâncias pécticas poliméricas contidas na parede celular de vegetais sendo, portanto, empregadas no processamento de sucos de frutas, vinhos, extrato de tomate, bem como no tratamento de resíduos vegetais, entre outras aplicações industriais. Os objetivos deste estudo foram otimizar a extração do suco da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) utilizando pectinase de *Saccharomyces cerevisiae* por meio da metodologia de superfície de resposta; e avaliar o efeito do tratamento enzimático nas características físicas e físico-químicas do suco. A pectinase utilizada neste estudo foi produzida por *Saccharomyces cerevisiae* conforme condições otimizadas por CARVALHO et al. (2016 no prelo). Foi realizado um delineamento do tipo composto central rotacional (DCCR) para avaliar o efeito do teor de extrato enzimático bruto (0,5-5,0%), da temperatura (20-60 °C) e da agitação do sistema (0-200 rpm) na extração, em 60 min. Como resposta avaliou-se incremento de turbidez, de rendimento, de viscosidade e diferença de cor. Todos os resultados foram calculados pela relação entre o ensaio em questão e um controle sem tratamento enzimático. Todas as variáveis dependentes, com exceção da viscosidade, apresentaram diferença estatística significativa na faixa de estudo analisada, sendo a agitação o parâmetro de maior influência positiva em todas as respostas. O tratamento enzimático proporcionou incremento de rendimento máximo, quando comparado ao controle, de 156 % a mais de suco extraído após filtração. Os valores ótimos para este processo foram: concentração da enzima, temperatura e agitação de 1%; 20°C e 200 rpm, respectivamente. Sob as condições otimizadas e validadas, o suco apresentou incremento de turbidez, rendimento, viscosidade e diferença de cor de respectivamente, 2267%; 97%; 0,93% e 30,76. Este produto apresentou: pH 3,6; densidade 1,038; atividade de água 0,96; umidade 91%;

sólidos solúveis 9,4 °Brix; acidez total 3,86 g ácido cítrico/100mL; açúcares totais e redutores 6,27 g/100mL e 4,79 g/100mL respectivamente; e ácido ascórbico 11,11mg/100g.

Palavras-chaves: Levedura pectinolítica; Resíduo agroindustrial; Enzima microbiana; Fruto tropical; Tecnologia de processamento de sucos.

1.0 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas e estima-se que a parcela de produção destinada ao processamento deve aumentar no período de 2016-2024 (OECD-FAO, 2015). O Brasil exportou, de janeiro a maio de 2015, quase um bilhão de dólares em suco de laranja (SENAR, 2016) e no mês de junho/2015, por exemplo, os sucos ocuparam a terceira posição nas exportações de produtos brasileiros do agronegócio, contabilizando 72,49 e 1,28 milhões de dólares em suco de laranja e de outras frutas, respectivamente (PORTAL BRASIL, 2015).

As pectinases constituem um conjunto de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécicas presentes em matrizes vegetais, através de mecanismos de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (TAPRE e JAIN, 2014).

Uma vez que atuam na degradação da pectina presente na parede celular de vegetais, as pectinases são largamente utilizadas nos processos de extração e clarificação de sucos de frutas, reduzindo a viscosidade, a turbidez e melhorando a eficiência do processo de filtração destes produtos (SHARMA, PATEL E SHARMA, 2014; CERRETI et al., 2016; GARG et al., 2016).

Desprende-se a partir destes dados, que o Brasil consome um valor significativo de pectinases/ano e que outros processos de extração enzimática de sucos de frutas devem ser desenvolvidos com o intuito de tornar ainda mais expressivo este setor nas diferentes regiões do País, cada qual com seus frutos típicos. É importante destacar que a agroindústria gera uma vultosa quantidade de biomassa vegetal e de resíduos ricos em pectina, passíveis de utilização como meio alternativo para a produção de pectinases microbianas (PANDA et al., 2016; POONDLA et al., 2016). Este fato aponta que o país pode ocupar uma posição de destaque não somente como grande consumidor de pectinases, mas também, como potencial produtor destas enzimas.

Neste contexto, estudos que associem a diversidade de frutas regionais e de inovações tecnológicas que resultem em um maior aproveitamento de seus produtos e resíduos, revestem-se de importância, sob o aspecto econômico, tecnológico e ambiental, e são estratégicos para a agroindústria brasileira. Os objetivos deste trabalho foram otimizar a extração do suco da polpa de cupuaçu utilizando pectinase de *Saccharomyces cerevisiae* por meio da metodologia de superfície de resposta e avaliar o efeito do tratamento enzimático nas características físicas e físico-químicas do suco.

2.METODOLOGIA

2.1 AQUISIÇÃO E MANUTENÇÃO DAS POLPAS

Foram adquiridas polpas de cupuaçu comerciais, utilizadas nos ensaios de otimização das condições para extração do suco de cupuaçu. As polpas foram mantidas em freezer a -20°C.

2.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR *S. CEREVISIAE* E EXTRAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Leveduras da espécie *S. cerevisiae*, foram utilizadas para a preparação da suspensão de células padronizada, a partir da cultura *overnight* em meio ágar Sabouraud, e progressivamente ajustadas com solução salina à absorbância de 0,7 u.a, valor este correspondente a 10^8 células. mL⁻¹ (BARBOSA, 2013). Para a produção de enzimas, cada meio foi inoculado com 0,1 mL.g⁻¹ de suspensão celular padronizada. A produção de enzimas ocorreu nas condições ótimas de fermentação em estado sólido, com incubação durante 24 horas, a 30 °C, em regime estático, utilizando como substrato farinha de resíduo de maracujá e tampão (pH 5.0, 0,2M) na proporção de 0,5g de farinha/mL de tampão. O complexo enzimático foi extraído adicionando-se 1 mL.g⁻¹ de solução tampão acetato (pH 5.0, 0,2M) ao meio fermentado, sendo este em seguida centrifugado (centrífuga Heraeus Megafuge, 16 R, Canadá) a 4°C, 3500 x g durante 15 minutos, para a precipitação da massa celular, e o sobrenadante (extrato bruto enzimático) utilizado para a extração do suco de cupuaçu.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DO SUCO DE CUPUAÇU.

Para cada ensaio utilizou-se 100 mL de polpa de cupuaçu comercial e a concentração de enzima, bem como temperatura e agitação do processo variaram de acordo com a estratégia de planejamento experimental, de acordo com Rodrigues e Iemma (2005) e Moyo et al. (2003). Foi realizado um delineamento central rotacional (DCCR) com 17 ensaios (8 fatoriais, 6 axiais e 3 no ponto central) e quatro variáveis dependentes: rendimento, turbidez, diferença de cor e de viscosidade. Para o cálculo do incremento alcançado foi extraído um suco controle, sem tratamento enzimático, e os valores obtidos para os sucos extraídos em cada ensaio foram comparados com esse controle. As faixas de variação estudadas foram selecionadas com base na literatura e estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Variáveis independentes. Valores codificados e decodificados utilizados no planejamento experimental visando maior extração de suco de cupuaçu

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Agitação (rpm)	0	40	100	160	200
Temperatura °C	20	28	40	52	60
Extrato enzimático bruto(%)	0,5	1,4	2,25	4,1	5

Os tratamentos enzimáticos foram conduzidos no pH natural da polpa ($3,32 \pm 0,01$), durante 60 minutos. Após cada tratamento, a polpa tratada foi submetida a tratamento térmico ($100^{\circ}\text{C}/5\text{min}$) para desnaturação enzimática (GAMBOA-SANTOS et al, 2012; KOSHANI et al., 2015) sendo, em seguida, filtrada sob vácuo, em papel filtro qualitativo. O suco controle foi obtido por filtração de polpa que não passou por tratamento enzimático prévio. A análise dos dados do delineamento experimental foi realizada utilizando o software STATISTICA (versão 7.0). Foi realizada a análise de variância (ANOVA) na qual avaliou-se a confiança dos valores obtidos e a adequação do modelo segundo o valor de r^2 e o teste de F (SAGU et al., 2014; RODRIGUES E IEMMA, 2005).

2.4 VARIÁVEIS DEPENDENTES

2.4.1 Rendimento

O rendimento foi determinado de acordo com a metodologia de Lee et al. (2006) adaptada. Cem mililitros de polpa tratada de cupuaçu foram filtrados sob vácuo (Primatec, bomba a vácuo e compressor 132, Brasil) por papel filtro qualitativo e o volume filtrado no tempo de 15 minutos foi aferido. O Incremento do rendimento de cada ensaio foi calculado segundo a Equação 1.

$$((V_{\text{amostra}} - V_{\text{controle}}) / V_{\text{controle}}) * 100 = I\eta \quad [1]$$

Onde,

$I\eta$ = Incremento do rendimento (%);

V_{amostra} = Volume filtrado (mL) em 15 minutos da amostra;

V_{controle} = Volume filtrado (mL) em 15 minutos do controle.

2.4.2 Turbidez

A turbidez foi avaliada de acordo com a metodologia adaptada de Lee et al. (2006), pela medida da absorvância a 590 nm, aferida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 2700, Japão). O cálculo do incremento foi realizado segundo a Equação 2.

$$((ABS_{amostra}-ABS_{controle}) / ABS_{controle})*100 = I_{abs} \quad [2]$$

Onde,

I_{abs} = incremento da absorvância;

$ABS_{amostra}$ = absorvância aferida da amostra (u.a.);

$ABS_{controle}$ = absorvância aferida do controle (u.a.).

2.4.3 Cor

A amostra filtrada foi submetida à análise colorimétrica, de acordo com Gilvanete (2008), na qual a diferença de cor entre dois estímulos, o controle e a amostra, pode ser quantificada. Utilizou-se um colorímetro (Konica Minolta, CM-5MinoltaCo., Japão) para mensurar os parâmetros de cromacidade CIE L^* , a^* e b^* (IBARRA-JUNQUEIRA et al.; 2014; MAGRO et al., 2016a), que foram utilizados para o cálculo da diferença de cor, segundo a Equação 3 (PATHARE et al., 2013).

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad [3]$$

2.4.4 Viscosidade

O estudo do comportamento da viscosidade aparente foi realizado em um viscosímetro (Lamy Rheology, RM 200, França) em programa MS-DIN 11, com torque constante de 0,082 N.m, em temperaturas de 25 a 30 °C e a duração de cada ensaio foi de 30 segundos. Os dados obtidos foram expressos como viscosidade em mPa.s, sendo o incremento calculado de acordo com a Equação 4.

$$((Viscosidade_{amostra}-Viscosidade_{controle})/Viscosidade_{controle})*100 = I_{viscosidade} \quad [4]$$

2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO SUCO OBTIDO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.

Uma vez determinadas as condições ótimas de agitação, temperatura e teor de extrato bruto enzimático, foi realizado ensaio para extração do suco nessas condições, de forma a validar o planejamento experimental, e o produto obtido foi caracterizado de acordo com as

avaliações descritas a seguir, todas realizadas em triplicata, exceto quando informado diferentemente.

2.5.1 Densidade

A densidade foi determinada utilizando-se picnômetro. A densidade da amostra foi calculada a partir da Equação 5.

$$D_{\text{absoluta}} = m/V \quad [5]$$

Onde,

D_{absoluta} = Densidade absoluta do suco, (g/mL);

m = peso, do picnômetro tarado com o suco (g);

V = volume do picnômetro (mL).

2.5.2 Atividade de água

A atividade de água foi medida em higrômetro (Aqua-Lab digital, Decagon Devices Inc., EUA), em temperatura constante de 25°C.

2.5.3 Sólidos totais

O teor de sólidos do suco foi avaliado pelo método gravimétrico em estufa a 105°C, em quintuplicata, expresso em % de umidade.

$$((m_1 - m_2) / (m_1 - m_0)) * 100 = U \% \quad [6]$$

Onde,

U = umidade (%);

m_0 = massa do cadinho (g);

m_1 = massa do cadinho com amostra (g);

m_2 = massa do cadinho com amostra (g) dessecado, peso constante.

2.5.4 Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis foram avaliados em °Brix por determinação em refratômetro digital automático (analytik Jena).

2.5.5 pH

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando pHmetro (Biovera, PB 1800, Brasil).

2.5.6 Acidez total

A acidez foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Magro et al. (2016a), por titulação com NaOH, na presença de indicador fenolftaleína e expressa em g de ácido cítrico/100 mL de suco.

2.5.7 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi baseada no método titulométrico de Lane-Eynon, utilizando as soluções de Fehling, de acordo com Tavares et al. (2010), expresso em g de glicose/100 mL de suco.

2.5.8 Açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados baseado no método titulométrico de Lane-Eynon, utilizando as soluções de Fehling, após hidrólise ácida, de acordo com Tavares et al. (2010), expresso em g de glicose/100 mL de suco.

2.5.9 Ácido ascórbico

Para determinação do teor de ácido ascórbico utilizou-se o método de Tillmans, usando DCFI, adaptado de Cunha et al. (2014), expresso em mg ácido ascórbico/100 g de suco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram estudadas as condições ótimas de extração de suco de cupuaçu pela aplicação de enzimas pectinolíticas de *S. cerevisiae* produzidas em meio de resíduo de maracujá.

3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLITICAS DE *S. cerevisiae*

A enzima utilizada no presente trabalho teve os parâmetros de sua produção previamente otimizados por planejamento estatístico multivariável (CARVALHO et al., 2016), apresentando atividade pectinolítica total de 7,066 U/mL e atividade de poligalacturonase, pectina metil esterase, pectina liase e pectatoliase de 3,48; 0,079; 3,07 e 0,8 U/mL, respectivamente, Poondla et al. (2015) avaliando 5 cepas de leveduras distintas identificou *S. cerevisiae* como a estirpe de maior produção de pectinases comparado com as demais estirpes. Couto (2008), detectou a presença de pectina metil esterase (PME) e pectina liase (PL), por duas espécies de *S. cerevisiae*. Gaivors et al. (1994) detectaram a presença de

PME, poligalacturonase (PG) e PL produzido por *S. cerevisiae*. As diversas enzimas específicas produzidas por essa cepa de levedura fazem com que ela possua um papel importante na indústria de alimentos destacando-se como a espécie mais explorada comercialmente entre as leveduras (POONDLA et al., 2015).

3.2 TRATAMENTO ENZIMÁTICO - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Polpas de frutas são geralmente ricas em polissacarídeos provenientes da parede celular dos vegetais, especialmente pectina, celulose, hemicelulose e amido (KUMAR, 2015). De forma geral, credita-se a maior parte da consistência e da turbidez de polpas e sucos de frutas à presença de substâncias pécticas (ISMAIL et al., 2016). Diversos autores reportam que a utilização de pectinases aumenta o rendimento de suco e melhora a extração de compostos bioativos, pigmentos e aromas (KHANDARE et al., 2011).

A Tabela 9 apresenta os ensaios realizados e os resultados obtidos para as variáveis dependentes (respostas): incremento de turbidez, de rendimento, de viscosidade e de cor (ΔE^*). Todos os resultados foram calculados pela relação entre o ensaio em questão e um produto controle, obtido sem tratamento enzimático prévio.

Tabela 9. Matriz do delineamento composto central rotacional e respostas em incrementos de turbidez, rendimento, viscosidade e cor.

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes (respostas)			ΔE^*
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Enzima (%)	Turbidez (%)	Rendimento (%)	Viscosidade (%)	
1	28	40	1,4	1679	156	3,58	18,03
2	28	40	4,1	1540	10	2,41	14,09
3	28	160	1,4	2092	117	2,47	25,35
4	28	160	4,1	1860	-27	1,45	15,23
5	52	40	1,4	1590	131	2,59	10,83
6	52	40	4,1	1604	156	2,27	10,90
7	52	160	1,4	2095	-38	0,85	30,51
8	52	160	4,1	2009	13	1,59	24,17
9	20	100	2,75	1693	8	0,91	13,72
10	60	100	2,75	1604	-6	0,82	15,36
11	40	100	2,75	1369	8	2,27	8,83
12	40	200	2,75	2140	113	4,52	23,50
13	40	100	0,5	1581	15	0,94	14,43
14	40	100	5	1005	-38	2,19	8,76
15	40	100	2,75	1762	19	-0,80	15,28
16	40	100	2,75	1770	17	2,22	12,63
17	40	100	2,75	1730	19	1,79	12,22

3.2.1 Turbidez

De acordo com Radomirovic et al. (2013), é possível estimar a turbidez de uma suspensão pela avaliação de sua densidade óptica, aplicando análise de absorvância no espectro visível. Esse resultado é influenciado por diversas características da amostra, mas sobretudo, pela quantidade e pelo tamanho das partículas em suspensão: quanto maior a quantidade e menor o tamanho, maior a turbidez. No presente estudo a turbidez foi aferida através da leitura da absorvância a 590 nm, seu incremento foi calculado de acordo com a Equação 2 e os resultados para cada teste estão apresentados na Tabela 9. Esperava-se que as melhores formas de extração levassem à obtenção de sucos com maior teor de sólidos e, conseqüentemente, maior incremento de turbidez (VAILLANT et al., 2008). A ação das enzimas pectinolíticas deve promover a hidrólise da pectina de alta massa molecular liberando frações de menor massa; essas frações migram para o suco extraído e, sendo negativamente carregadas, se mantêm em suspensão, causando turbidez. Em comparação com a matéria-prima contendo pectina de alta massa molecular, a turbidez do suco é maior, pois a absorvância promovida por partículas de menor tamanho tende a ser maior (PINELO et al., 2010; SIEBERT et al., 2006).

A análise de variância para a resposta turbidez mostrou que o modelo de superfície de resposta desenvolvido foi adequado: valor de $r^2 = 0,777$ e valor de F calculado 2,5 vezes maior que F tabelado, significativo em nível de significância de 99%. A variável de maior influência para a turbidez foi a agitação, seguida da concentração de enzima (material suplementar).

A temperatura de reação não mostrou influência significativa na faixa testada, indicando não haver necessidade de controle da temperatura do meio reacional dentro do intervalo testado (20 - 60 °C). Isso representa uma importante economia de energia para o processo, além de garantir sua efetividade mesmo quando este for conduzido em baixa temperatura, com a finalidade de promover a manutenção de vitaminas e compostos bioativos no produto final, ou em alta temperatura, para evitar contaminação microbiana ou provocar a desnaturação de enzimas termolábeis possivelmente provenientes do cupuaçu.

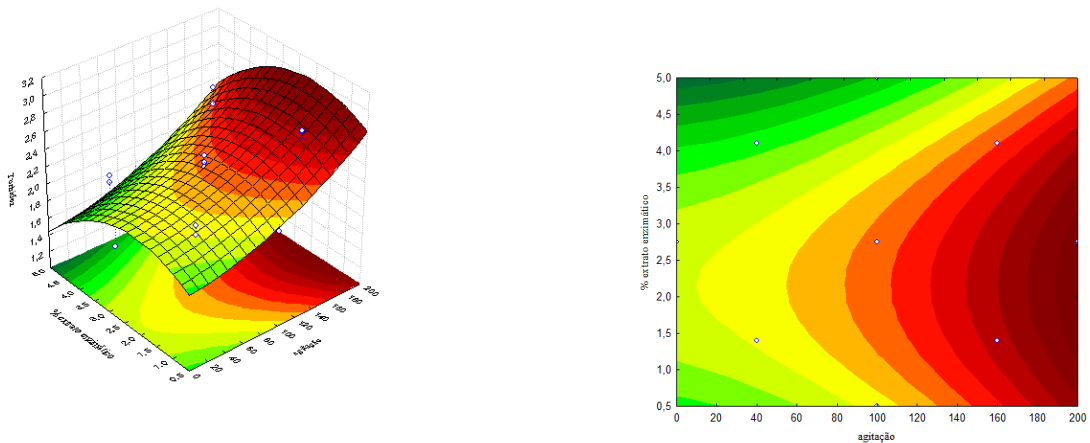


Figura 10. Influência das variáveis “agitação (rpm)” e “teor de extrato bruto enzimático (%)” na turbidez de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.

Pela observação da Figura 10 nota-se, que para obtenção de sucos mais turvos foi necessária a aplicação de agitação próxima de 200 rpm. A agitação do meio reacional tem a finalidade de homogeneizar as condições de reação (garantir as transferências de calor e massa) e promover o contato adequado entre enzima e substrato. Agitação excessiva, no entanto, pode levar à desnaturação mecânica das enzimas, em consequência da geração de forças de cisalhamento no meio reacional (INGESSON et al., 2001). Apesar da importância dessa variável, a maior parte dos trabalhos envolvendo otimização da clarificação e/ou extração enzimática de sucos por aplicação de enzimas pectinolíticas não avalia sua influência nas respostas obtidas (KUMAR, 2015). Alguns trabalhos reportam agitação constante, sem especificar a velocidade (VAILLANT et al., 2008), e é possível encontrar estudos aplicando agitação de 150 (POONDLA et al., 2016) e de 100 rpm (SANDRI et al., 2013). Por ser um produto muito viscoso e com grande número de partículas em suspensão, a polpa de cupuaçu pode ter dependido de agitação em alta velocidade para garantir a homogeneização necessária.

O teor de extrato bruto enzimático (%) apresentou faixa de ótimo, variando entre aproximadamente 1,0 e 3,25% (Figura 10), sendo essa faixa ligeiramente mais larga em temperaturas próximas de 60°C e ligeiramente mais estreita quando a temperatura se aproxima de 20°C (material suplementar). Esse resultado confirma a eficiência das enzimas pectinolíticas testadas na hidrólise da fração péctica do cupuaçu, uma vez que pequenas concentrações de extrato bruto são suficientes para alcançar os melhores resultados. No entanto, a aplicação de teores acima de 3,25% de extrato bruto enzimático teve como consequência a redução da turbidez do suco obtido. É possível que atividade pectinolítica em excesso seja responsável pela hidrólise da pectina presente nas partículas em suspensão, envolvendo núcleos proteicos positivamente carregados. Quando isso acontece, a exposição

desses núcleos leva à agregação das partículas e sua precipitação ou remoção durante a filtração, resultando em um produto clarificado, de baixa turbidez (PINELO et al., 2010; CERRETI et al., 2016).

As superfícies obtidas foram descritas pela Equação 10.

$$1,71+(0,00113*a) +(0,000017*a^2)+(0,3476*e)+(-0,0806*e^2) = \text{Turbidez [10]}$$

Onde,

a = Agitação (rpm);

e = Enzima (%);

t = Temperatura (°C);

Turbidez = u.a.

Substituindo-se os valores considerados ótimos para incremento de turbidez (agitação de 200 rpm, teor de extrato bruto enzimático 1% e temperatura ambiente 25°C), verifica-se que o melhor resultado obtido seria 2,87 u.a., correspondendo a um aumento de 2200% em comparação com o suco controle, obtido sem aplicação de enzimas.

3.2.2 Cor

A cor dos sucos de frutas é um importante critério de aceitação pelos consumidores, que vem recebendo grande atenção da indústria produtora (BHAT, 2016). A composição química e a estrutura do material vão definir sua capacidade de alterar a distribuição espectral da luz (GILVANETE, 2008). Os atributos definidos pela CIE, L*, a* e b*, foram usados para o cálculo da diferença de cor. L* indica a luminosidade (0-100) onde zero é preto e 100 representa o branco, a* indica a cor entre vermelho-verde e b* indica cor entre amarelo-azul (WIBOWO et al., 2015).

Após os ensaios de extração enzimática do suco de cupuaçu, o parâmetro de cor de maior variação foi a luminosidade, que foi maior nas amostras tratadas enzimaticamente (maior valor de L* = 34,22, no ensaio 7 e menor valor de L* = 12,64, no ensaio 11) quando comparadas ao controle (L* = 3,88), indicando a produção de sucos mais brancos. Nos trabalhos de Kunitake et al. (2014) e de Bhat (2016) a maior variação também aconteceu no parâmetro referente à luminosidade. Os sucos tratados enzimaticamente também mostraram maiores valores para a* e para b*, embora as diferenças tenham sido menores do que para L*. Enquanto o controle apresentou a* = -0,43, o ensaio com amostra mais esverdeada (ensaio 7), apresentou a* = -3,24 e o com a amostra menos esverdeada ainda apresentou a* = -0,94 (ensaio 5). No caso da coordenada b*, o controle apresentou valores ligeiramente mais

azulados ($b^* = -1,83$) do que o ensaio com menor valor de b^* ($b^* = -1,66$, ensaio 1), porém o ensaio com maior valor de b^* ($b^* = -4,92$, ensaio 12) apresentou coloração notadamente mais azulada que o controle. Se considerarmos que, segundo Silva e Silva (1999), a polpa fresca de cupuaçu apresenta os seguintes valores de cor: $L^* = 70,04$; $a^* = -6,36$ e $b^* = 19,73$, verificamos que o processo de extração de sucos leva à formação de um produto com muito menos cor e que, quanto maiores forem os valores de incremento de cor obtidos para os ensaios, melhor terá sido a extração do suco.

A análise de variância para a variável diferença de cor mostrou que o modelo de superfície de resposta desenvolvido foi adequado. O valor de r^2 relativo à equação para ΔE^* foi de 0,74 e valor de F calculado (10,39) considerado significativo em nível de significância de 99%.

O efeito das variáveis testadas no incremento de cor pode ser observado nas Figuras 11 e 12. No presente estudo, a agitação foi a variável que mais influenciou a diferença de cor, seguida da interação entre as variáveis temperatura de reação e agitação (material suplementar). Pela observação da Figura 11, pode-se verificar que em temperaturas acima de 55 °C, a aplicação de agitação de 200 rpm levou à obtenção de sucos com maior diferença de cor em relação ao controle. Também foi significativa a influência da concentração de extrato bruto enzimático na alteração da cor do suco extraído. Nesse caso, quanto menor o teor de extrato enzimático utilizado, maiores os incrementos de cor encontrados (Figura 12). O efeito da agitação e do teor de extrato enzimático sobre a cor pode ser explicado de forma semelhante ao que acontece com a turbidez, uma vez que ambas as características estão diretamente ligadas à passagem de sólidos solúveis e insolúveis da polpa para o suco extraído. Assim, é provável que maiores velocidades de agitação tenham levado a um melhor contato entre enzima e substrato, gerando uma hidrólise mais eficiente, que se traduziu na obtenção de sucos com mais cor. Da mesma forma, teores elevados de extrato enzimático podem provocar a precipitação de pectina da suspensão, impedindo sua passagem para o suco e reduzindo o teor de compostos coloridos no produto final.

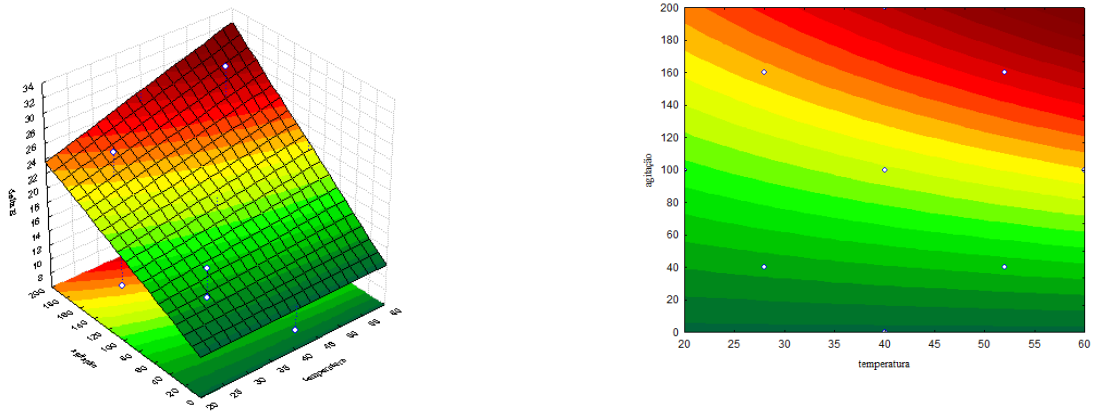


Figura 11. Influência das variáveis “agitação (rpm)” e “temperatura de reação (°C)” na diferença da cor (ΔE) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta

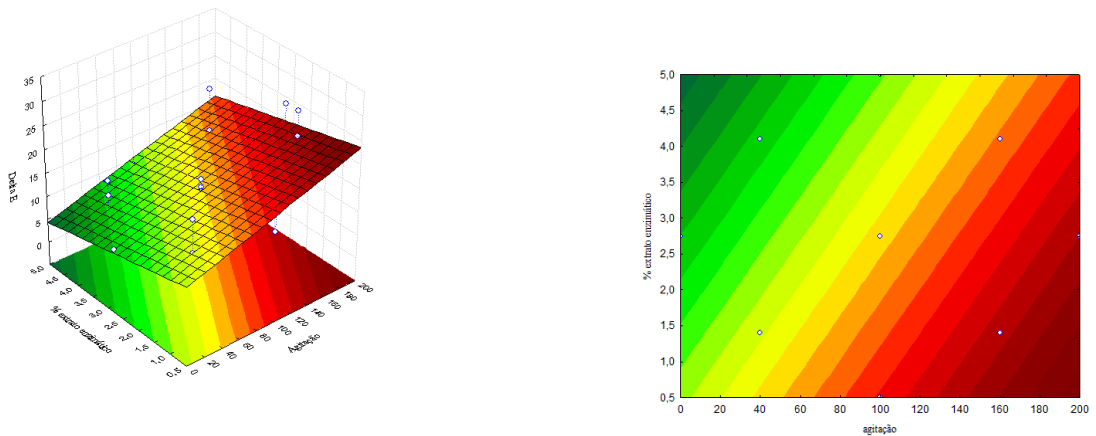


Figura 12. Influência das variáveis “agitação (rpm)” e “teor de extrato bruto enzimático (%)” na diferença da cor (ΔE) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta

As superfícies obtidas foram descritas pela Equação 11.

$$12,48 + (0,038*a) + (-1,63*e) + (0,001*t*a) = \Delta E \quad [11]$$

Onde,

a = agitação (rpm);

e = Enzima (%);

t = Temperatura (°C);

ΔE = Diferença de cor.

A partir da Equação 11, substituindo-se as variáveis pela condição ótima de temperatura (55°C), agitação (200 rpm) e teor de enzima (0,5 %), a diferença de cor obtida

após extração de suco em condições otimizadas pela aplicação de extrato bruto enzimático de *S. cerevisiae* seria de 30,27.

3.2.3 Rendimento

Exemplos de trabalhos que fizeram a aplicação de enzimas pectinolíticas para a extração de sucos de frutas são: Paranjpe et al. (2012), na produção de suco de uva obteve aumento de 32-48% no rendimento, Paludo et al. (2011), na extração de suco de cenoura obteve ganho de até 20% no rendimento do produto. Teixeira et al. (2011) utilizando extrato bruto de pectinase produzida por *Aspergillus japonicus* 586 verificaram rendimento de extração de suco de cupuaçu mínimo de 94% e ressaltaram que o tratamento enzimático também foi eficiente para diminuição dos resíduos gerados neste processo.

No presente trabalho, a aplicação de enzimas pectinolíticas levou a maiores rendimentos em suco, quando comparados com o produto obtido na ausência de enzimas. Esse comportamento foi reportado por diversos autores, cujos dados foram compilados por Kumar (2015). Os melhores resultados obtidos alcançaram valores superiores a 2,5 vezes mais suco extraído (ensaios 1 e 6). Esses valores foram maiores do que os obtidos em outros trabalhos semelhantes: Khandare et al. (2014) obtiveram 33% maior rendimento após aplicação de pectinases de *A. niger* na extração de suco de cenoura; Magro et al. (2016b) aumentaram em 75,8% a extração de suco de uva da variedade Concord em condições otimizadas, aplicando enzimas pectinolíticas imobilizadas.

A análise de variância para a variável rendimento indicou que houve diferença significativa entre as respostas e que esta diferença pode ser creditada às diferenças entre as variáveis independentes (F calculado = 2,63, significativo em 95% de confiança). A agitação foi a variável de maior influência positiva na resposta (quanto maior a agitação, maior o rendimento) e o teor de extrato enzimático foi a variável de maior influência negativa na resposta (quanto menor, maior o rendimento). Novamente, esse comportamento pode ser explicado para o aumento de rendimento, da mesma forma que foi para incremento de viscosidade e de cor. Isto é: quanto maior a agitação, maior o contato entre enzima e substrato e maior a eficiência da hidrólise, porém, teores altos de enzimas pectinolíticas podem levar à precipitação de sólidos da polpa, impedindo sua passagem para o suco e diminuindo o rendimento. A influência da temperatura foi considerada significativa, com influência positiva, porém de menor importância que as demais (material suplementar). No entanto, a equação gerada para descrever o comportamento do processo não apresentou ajuste aceitável

($r^2 = 0,594$), indicando que, possivelmente, o modelo descritivo ideal não seria nem linear nem quadrático, não permitindo portanto, a obtenção de superfície de resposta e de uma equação matemática preditiva para esta variável.

3.2.4 Viscosidade

Não houve diferença estatística significativa entre os ensaios para a variável dependente viscosidade, indicando que a agitação, a temperatura de reação e o teor de extrato enzimático, na faixa de estudo analisada, não apresentaram influência no incremento da viscosidade dos sucos extraídos em comparação com a viscosidade do suco controle, obtido sem tratamento enzimático prévio. A viscosidade de sucos de frutas é causada, sobretudo, pela presença de polissacarídeos de alta massa molecular provenientes da parede celular vegetal, especialmente pectina. A atividade de enzimas pectinolíticas tem como efeito a hidrólise da pectina presente, com consequente redução da viscosidade (KUMAR, 2015).

4. VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E CARACTERIZAÇÃO DO SUCO OBTIDO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.

O modelo validado apresentou valor observado de turbidez próximo ao predito pela equação, de 2,96 e 3,03 u.a. respectivamente, comprovando assim a validade do modelo. Em relação à diferença de cor, o valor observado (30,76) foi distante ao valor previsto pela equação 22,74. O incremento do rendimento observado de 97% foi superior ao predito pela equação 54%, e a viscosidade observada foi bem mais baixa do que a prevista pela equação 3,553 e 6,5 mPa.s respectivamente, resultados esperados, uma vez que não houve diferença significativa entre os ensaios e/ou a equação não foi preditiva. A tabela 10 apresenta os resultados da caracterização físico-química do suco de cupuaçu extraído nas condições: 20 °C, 200 rpm e 1 % de concentração enzimática.

Tabela 10. Características do suco de cupuaçu

Característica avaliada	Resultado
Sólidos solúveis (°Brix)	9,4
Umidade (%)	91,262 ± 0,042
pH	3,60 ± 0,023
Atividade de água	0,96 ± 0,010
Densidade (g/mL)	1,038 ± 0,001
Acidez total (g /100mL)	3,86 ± 0,337
Açúcares redutores (g/100 mL)	4,79 ± 0,062
Açúcares totais (g/100mL)	6,27 ± 0,100
Ácido ascórbico (mg/100g)	11,114 ± 0,995

A umidade é uma medida muito utilizada em análise de alimentos, através dela é possível estudar a estabilidade, composição e qualidade dos alimentos, sucos de frutas possuem umidade elevada, o teor de umidade determinado no presente estudo, 91% está compatível com valores obtidos para suco de cupuaçu (84,47% segundo LIRA et al., 2012) e também com os valores em geral encontrados para sucos de frutos tropicais, para o suco de açaí Fragonesi et al. (2010) encontraram umidade de 89,90 - 90,01, Lago, Gomes e Silva, (2006) encontraram para o jamelão umidade de 87,75% e sólidos solúveis de 9,00 %. O teor de sólidos solúveis de 9,4 °Brix encontrado para o suco de cupuaçu do presente estudo foi semelhante aos valores obtidos por outros autores, disponíveis na literatura: 9,0 °Brix (GILVANETE et al., 2008) e Fragonesi et al. (2010) encontraram °Brix de 9,98-10, para o suco de açaí. Pelos valores determinados para açúcares totais e acidez titulável, verifica-se que possivelmente a totalidade dos sólidos solúveis presentes no suco de cupuaçu é constituída de açúcares e ácidos.

O suco é considerado um alimento rico em água, atividade de água > 0,90, no suco extraído da polpa de cupuaçu a atividade de água foi, similar ao descrito por Santos et al (2010), que obteve valores entre 0,94 - 0,99.

O valor encontrado para o teor de açúcares redutores foi bastante superior à média publicada na literatura 2,9; 2,03 e 1,09 por Gilvanete (2008) Viana (2010) e Teixeira (2011), porém dentro da faixa encontrada por Santos et al. (2010) de 2,63-7,22 g/100g. O mesmo

comportamento foi observado para os teores de açúcares totais, em comparação com dados da literatura: 4,9 (GILVANETE; 2008) e 2,61-11,67 g/100g (SANTOS et al.; 2010).

O valor do pH do presente estudo foi próximo aos valores determinados por Gilvanete et al. (2008), Porte et al. (2010) e Viana, (2010), respectivamente de 3,3; 3,6 e 3,21, classificando o suco de cupuaçu como muito ácido, segundo classificação que se baseia no pH mínimo para a multiplicação da grande maioria das bactérias (4,0) (JAY, 2005). Nesse trabalho, no entanto, a acidez titulável do suco foi superior aos resultados obtidos por outros autores que estudaram suco de cupuaçu: 2,90% (g/100g) (VIANA, 2010) e 1,16% (g/100g) (SANTOS et al., 2010).

Segundo a FNB (Food and Nutrition Board), para o suco ser considerado elevada fonte de vitamina C deve conter 12 mg de ácido ascórbico/100g, o valor encontrado no presente estudo, 11,11 mg/100g indica o produto como fonte de vitamina C, quase sendo considerado de elevada fonte de vitamina C.

5. CONCLUSÃO

Estima-se que a aplicação de pectinase na extração de sucos de frutas reduza a viscosidade, aumente a eficiência da filtração e, por consequência cresça o rendimento global do processamento. Este estudo avaliou a aplicação de pectinase produzida por *Saccharomyces cerevisiae* em farinha de resíduo de maracujá, visando aumentar o rendimento do suco extraído da polpa de cupuaçu.

Através da metodologia de superfície de resposta foi possível verificar que a agitação do sistema e a concentração enzimática, na faixa de estudo analisada, impactaram nos parâmetros de turbidez, cor e rendimento do suco de cupuaçu. O incremento de rendimento, quando comparado ao controle (sem tratamento enzimático) foi de até 156% a mais de suco extraído. Em termos de rendimento do processo, observou-se que a agitação e o teor de extrato bruto enzimático foram as variáveis de maior impacto positivo e negativo, respectivamente, demonstrando que quanto maior a agitação, maior o contato entre enzima e substrato e maior a eficiência da hidrólise, mas que, entretanto, teores elevados de pectinase não são desejáveis e acredita-se que podem levar à precipitação de sólidos da polpa, impedindo sua passagem para o suco e diminuindo o rendimento.

Assim, pode-se inferir que sob o ponto de vista tecnológico e econômico, o processo mostrou-se promissor, uma vez que houve um incremento significativo do rendimento do suco utilizando uma baixa concentração de enzima, na forma de extrato bruto (não

purificada), produzida a partir de um resíduo agroindustrial. Esta pesquisa está em linha com a crescente produção de sucos de frutas regionais no mercado nacional, aliada à preocupação com o elevado índice de perdas e desperdícios gerados no campo e na indústria, e com os impactos econômicos e ambientais ocasionados por estes eventos. Este estudo constituiu-se, assim, como uma contribuição tecnológica interessante para o processamento de suco de cupuaçu e de outros frutos.

Considerando as variáveis do processo otimizadas neste trabalho, estudos adicionais que contemplem a produção desta enzima em larga escala e utilização deste sistema na indústria de sucos, tais como na imobilização enzimática, que permitam o escalonamento industrial e processamento contínuo, são vitais para a efetiva aplicação desta pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, 560714/2010-6 Edital MCT/CNPq/CT-BIOTEC nº 27 - Rede Nacional de Pesquisa em Leveduras, Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications. **Process Biochemistry**. v. 46, n. 8, p.1525 - 1537, 2011.
- BARBOSA, C. D. **Obtenção e caracterização de vinho e vinagre de manga (*Mangifera indica* L.): parâmetros cinéticos das fermentações alcoólica e acética**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2013.
- BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; SOUSA FILHO, M. M. S.; LIMA, I. F. B.; SOUZA, A. C. R.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, n. 1, p. 240 - 242, 2002 .
- BELDA, I.; CONCHILLO, L. B.; RUIZ, J.; NAVASCUÉS, E.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**. v. 223, p. 1 - 8, 2016.
- BHAT, R. Impact of ultraviolet radiation treatments on the quality of freshly prepared tomato (*Solanum lycopersicum*) juice. **Food Chemistry**. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616309980>>. Acesso em 04 de julho de 2016.
- CARVALHO, M.C.; SILVA, C.R.; UETANABARO, A.P.T.; COSTA, A.M.; FAI, A.E.C.; KOBLITZ, M.G.B. Use of multivariate statistical optimization of pectinase production by *Saccharomyces cerevisiae* from passion fruit (*Passiflora edulis*) residue. **Bioresource Technology**. No prelo. 2016.
- CERRETI, M.; LIBURDI, K.; BENUCCI, L.; ESTI, M. The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. **Lwt - Food Science And Technology**. v. 73, p.326 - 333, 2016.
- COSTA, M. P.; FRASAO, B, S.; SILVA, A, C. O.; FREITAS, M, Q.; FRANCO, R. M.; CONTE-JUNIOR, C.A. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal of Dairy Science**. v.98, n.9, 2015.
- COUTO, F. M. M. **Leveduras produtoras de β - glicosidase e pectinase**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em biologia de fungos), Universidade federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2008.
- CUNHA, K. D.; SILVA, P. R.; FARIA, A. L.; COSTA, S. F. TEODORO, A. J.; KOBLITZ, M. G. B. Ascorbic acid stability in fresh fruit juice under different forms of storage. **Brazilian Journal of Food Tecnology**. v.17, n.2, p. 139 - 145, 2014.
- FABER, M. A; YUYAMA, L. K. O. Nectar Mix Functional Based on Amazonian Fruits. **Journal of Cell Science & Therapy**. v.6, n.1, p.197 - 204, 2015.
- FREGONESI, B. M.; YOKOSAWA, C. E.; OKADA, I. A.; MASSAFERA, G.; BRAGA, T. E. COSTA2, PRADO, S. P. T. Frozen açai pulp. Study on the nutritional and physical-chemical characteristics, and microscopic and product labelling analyses. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.69, n.3, p.387-95, 2010.

- GAMBOA-SANTOS, S.; MONTILLA, J.; SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effects of Conventional and Ultrasound Blanching on Enzyme Inactivation and Carbohydrate Content of Carrots. **European Food Research and Technology**. v.234, n.6, p. 1071 - 1079, 2012.
- GILVANETE, M. F. **Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu – biopolímeros**. 2008. 120 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Estadual do Rio de Janeiro. 2008.
- GILVANETE, M. F.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; MAIA, M. C. A. Efeito da temperatura e taxa de cisalhamento nas propriedades de escoamento da polpa de cupuaçu (*T. Grandiflorum schum*) integral. **Revista Brasileira de fruticultura**. v.30, n. 2, p.385 - 389, 2008.
- IBARRA-JUNQUEIRA, V.; ESCALANTE-MINAKATA, P.; CHAVÉZ-RODRIGUEZ, A. M.; COMPARAN-DUEÑAS, I. A.; OSUNA-CASTRO, J. A.; ORNELA-PAZ, J. J.; PÉREZ-MARTINEZ, J. D.; AGUILAR, C. N. Optimization, Modeling, and Online Monitoring of the Enzymatic Extraction of Banana Juice. **Food Bioprocess Technology**. v.7, p.71 - 83. 2014.
- INGESSON, H.; ZACCHI, G.; YANG, B.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**. v. 88, p.177 – 182, 2001.
- ISMAIL, AM. S.; ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. A safe potential juice clarifying pectinase from *Trichoderma viride* EF-8 utilizing Egyptian onion skins. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X16300087>>. Acesso em 30 de junho de 2016.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª Ed. Porto Alegre. Artmed. 2005. 542.
- KHANDARE, V.; WALIA, S.; SINGH, M.; KAUR, C. Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. **Food and bioproducts processing**. v.8, n.9, p. 482 - 486, 2011.
- KOSHANI, R.; ZIAEE, E.; NIAKOUSARI, E.; GOLMAKANI, M. T.; Optimization of Thermal and Thermosonication Treatments on Pectin Methyl Esterase Inactivation of Sour Orange Juice (*Citrus Aurantium*). **Journal of Food Processing and Preservation**. Iran, v. 39, p. 567 - 573, 2015.
- KUMAR, S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. **Advances in Applied Science Research**. v.6, n.6, p.114 - 124, 2015.
- KUNITAKE, M.; DITCHFIELDI, C.; SILVAI, C.; PETRUS, R. Effect of pasteurization temperature on stability of an acidified sugarcane juice beverage. **Ciência e Agrotecnologia**. v.38, n.6, 2014.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of jambolan (*Syzygium cumini* Lamarck) jelly: processing, physicalchemical properties and sensory evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.4, p. 1 – 9, 2006.
- LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. V. S. A.; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, v.73, p.55 - 63, 2006.
- LIRA, J. S. S.; MELLO, A. A; AZEREDO, D. R. P. Caracterização físico-química da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum schum*) congelada. **Brazil Journal of Food Technology**. v. 12, n. 1, p.9 - 16, 2009.

MAGRO, L. D.; HERTZ, P. F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification. **The Royal Society of Chemistry**. v.6, p. 27242 - 27251, 2016a.

MAGRO, L. D.; DALAGNOL, L. M. G.; MANFROI, V.; HERTZ, P.; KLEN, M. P.; RODRIGUES, R. C. Synergistic effects of Pectinex Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice. **LWT - Food Science and Technol.** v. 72, p.157 - 165, 2016b.

Markets and Markets. **Food Enzymes Market by Type (Carbohydrase, Protease, Lipase), Application (Beverage, Processed Food, Dairy, Bakery, Confectionery), Source (Plant, Microorganism, Animal), Form (Lyophilised Powder, Liquid), & by Region - Global Forecasts to 2021**. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/industrial-enzymes.asp>>. Acesso em: 05 de julho de 2016a.

MOYO, S.; GASHEA, B. A.; COLLISONA, E. K.; MPUCHANEB, S. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**. v.85, p. 87 - 100, 2003.

National Institutes of Health (NIH) - Office Dietary Supplements. Disponível em: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>> Acesso em: 25 de julho de 2016.

OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en>. Acesso em: 07/07/2016.

PALUDO, M. C.; KRÜGER, R. L. Ação da enzima pectinase na extração do suco de jabuticaba. **Revistas Científicas da área da Saúde – UNIPAR**. v. 15, n. 3, p. 279 - 286, 2011.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Process Fruits: A review. **Food Process Technology**. v. 6, p. 36 - 60. 2013.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**. v.146, p.161 - 172, 2016.

PARANJPE, S. S.; FERRUZZI, M.; MORGAN, M. T. Effect of a flash vacuum expansion process on grape juice yield and quality. **LWT - Food Science and Technology**. v.48, n.2, p.147 - 155, 2012.

PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A.S. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Food and bioproducts processing**. v.8, n.8, p.259 - 265, 2010.

POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM. R.; OBULAM, A. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4, p.70 - 76, 2015.

Portal Brasil (Governo Federal). **Cinco países importam 53% do agronegócio brasileiro em junho**. Junho, 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/07/cinco-paises-importam-53-do-agronegocio-brasileiro-em-junho>>. Acesso em: 05 de julho de 2016.

- PORTE, A.; REZENDE, C. M.; ANTUNES, O. A. C.; MAIA, L. H. Redução de aminoácidos em polpas de bacuri (*Platonia insignis* Mart), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) e murici (*Byrsonima crassifolia* L.) processado (aquecido e alcalinizado). **ACTA Amazonica**. v. 40, n.3, p.573 - 578, 2010.
- RADOMIROVIC, T.; SMITH, P.; JONES, F. Using absorbance as a measure of turbidity in highly caustic solutions. **International Journal of Mineral Processing**. v.118, p.59 - 64, 2013.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas São Paulo, 5ª Ed. Casa do pão, 2005.
- SAGU, S. T.; NSO, E. J.; KARMAKAR, S.; DE, S. Optimisation of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. **Food Chemistry**. v. 151, p. 182 - 190, 2014.
- SANDRI, I. G.; LORENZONI, C. M. T.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Science and Technology**. v.51, p.469 - 475, 2013.
- SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; COSTA, J., M. C. C.; FONSECA, A. V. V. Antioxidant activity and correlations with bioactive components from commercial products of cupuaçu. **Ciência Rural**. v.40, n.7, p. 1636 -1642, 2010.
- Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR). **Brasil exportou, de janeiro a maio de 2015, quase um bilhão de dólares em suco de laranja**. Disponível em: <<http://www.senar.org.br/noticia/brasil-exportou-de-janeiro-maio-de-2015-quase-um-bilhao-de-dolares-em-suco-de-laranja>>. Acesso em: 05 de julho de 2016.
- SHARMA, H, P.; PATEL, H.; SHARMA, S. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits-A review. **Food Science and Nutrition**. v.2, n.1, p. 1 - 14, 2014.
- SIEBERT, J. K. Haze formation in beverages. **LWT - Food Science and Technology**. v.39, p. 987-994, 2006.
- SILVA, F. M.; SILVA, C. L. M. Colour changes in thermally processed cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) puree: critical times and kinetics modeling. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 34, p.87-94, 1999.
- TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**. v.21, n.2, p.447 – 453, 2014. *ARTIGO*
- TAVARES, J. T. Q.; CARDOSO, R. L.; COSTA, J. A.; FADIGAS, F. S.; FONSECA, A. A. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**. v.33, n.4, p. 805 – 809, 2010.
- TEIXEIRA, M. F. S.; JERUSA, S. A.; ORMWZINDA, C. C. F.; DURAN, N.; LIMA FILHO, J. L. L. Quality Attributes of Cupuaçu Juice in Response to Treatment with Crude Enzyme Extract Produced by *Aspergillus japonicus* 586. **Enzyme Research**. v. 2011, p.1 - 6, 2011.
- WELTI-CHANES, J.; OCHOA-VELASCO, C. E.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.10, p.457 - 462, 2009.
- WIBOWO, S.; VERVOORT, I.; TOMIC, J.; SANTIAGO, J. S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**. v.171, p. 330 - 340, 2015.

VAILLANT, F.; PÉREZ, A. M.; ACOSTA, O.; DORNIER, M. Turbidity of pulpy fruit juice: A key factor for predicting cross-flow microfiltration performance. **Journal of Membrane Science**. v.325, p. 404 - 412, 2008.

VIANA, A. D. **Propriedades termofísicas e comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*theobroma grandiflorum*) em diferentes concentrações e temperaturas**. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual da Bahia, Bahia, Brasil. 2010.

VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, V. P. R.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONÇALVES, A. C. A. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**. v.44, p. 1988 – 1996, 2011.

APÊNDICE- MATERIAL SUPLEMENTAR

1.METODOLOGIA

1.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDA DE ENZIMAS PECTINOLÍTICA

1.1.1 Solução mãe de ácido monogalacturônico

A solução mãe de ácido monogalacturônico, concentração de 8 mg/mL, pesou-se exatamente 80 mg (0,08g) de ácido monogalacturônico e o volume foi completado, em balão volumétrico, para 20 mL, a partir da solução mãe realizaram-se as diluições da tabela 11.

Tabela 11. Concentração do ácido monogalacturônico 8 - 0,4 mg/mL

Ponto	Solução mãe (mL)	Água destilada/Tampão pH 7,5 (mL)	Concentração (mg/mL)
1	1	0	8
2	0,5	0,5	4
3	0,4	0,6	2
0,7	0,3	0,7	1,6
5	0,2	0,8	1,2
6	0,1	0,4	0,8
7	0,05	0,45	0,4
8	0	1	BRANCO

1.1.2 Curva padrão de DNS

A solução de DNS é composta por 0,025g/mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico juntamente com 0,75 g/mL de tartarato de sódio e potássio em NaOH 1M para 1,5 mL de água.

De cada frasco contendo solução mãe de ácido monogalacturônico nas concentrações indicadas na tabela 12. de cada tubo foram retiradas 600 uL e adicionado 600 uL de solução de DNS esta mistura foi levada à ebulição por 15 minutos, depois de resfriada foi adicionar 6 mL de água destilada e feita a leitura a 540 nm. Critério para uso da solução, coeficiente linear da reta deve ser $\geq 0,97$.

1.1.3 Curva padrão de azul de bromotimol

A curva padrão de azul de bromotimol, feita a partir da solução mãe de ácido monogalacturônico. A cada tubo de ensaio identificado previamente nas diluições da solução mãe de ácido monogalacturônico (tabela 12), foi adicionado de 0,375 mL/mL de azul de bromotimol 0,01%; 2,5 mL/mL da solução mãe em diferentes concentrações; 0,5 mL/mL NaCl 1M (todos os reagentes foram feitos a partir de solução tampão pH 7,5). Os tubos foram levados à ebulição por 5 minutos, resfriados, adicionado 6mL de água, e a absorbância foi aferida. Critério para uso da solução, coeficiente linear da reta deve ser $\geq 0,97$.

1.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS

1.2.1 Obtenção e manutenção das leveduras

Foram gentilmente cedidas leveduras pertencentes à Coleção de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB), isoladas em dornas de fermentação de cachaça e identificadas como *S. cerevisiae*, previamente selecionadas como possíveis secretoras de pectinases. As linhagens foram cultivados em placas de petri contendo meio sólido com pectina a 1% como única fonte de carbono de acordo com a metodologia modificada de McKay (1988). A capacidade de degradação da pectina pelas leveduras testadas foi verificada no meio sólido pela presença do halo de degradação representado pelas zonas mais claras ao redor da colônia. Posteriormente, foi feita a caracterização molecular das leveduras que foram identificadas como *Sacharomyces*.

As leveduras foram mantidas cultura mantida em microtubos contendo 80% de solução salina (NaCl a 85%) e 20% de glicerol estéril e estocadas -80°C em ultrafreezer (Indrel, IULT 335 D, Brasil). Quatro cepas foram testadas, a fim de, avaliar a cepa de maior potencial secretor de pectinases. Anteriormente a avaliação as leveduras foram submetidas a meio Sabouraud Dextrose durante 24 horas para sua ativação.

1.2.2 Meio mínimo

As cepas foram cultivadas em meio mínimo, em erlenmeyer contendo fosfato de amônio 0,7 g/100mL, fosfato dibásico de potássio 0,15 g/100mL, sulfato de magnésio 0,05 g/100mL, cloreto de cálcio 0,03 g/100mL, solução de traços de sais 0,025 mL/100mL e 0,5 g/100mL de pectina cítrica como única fonte de carbono. A partir da levedura foram preparadas suspensões padronizadas, utilizando-se como parâmetro a turbidez determinada por absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 2700, Japão) a 600 nm. As

suspensões foram preparadas assepticamente, a partir da cultura overnight em meio Ágar Sabouraud, e progressivamente ajustadas com solução salina à absorvância de 0,7 u.a, valor este correspondente a 10^8 células. mL⁻¹ (BARBOSA, 2013). Em cada ensaio foi inoculado 0,1 mL.g⁻¹ de suspensão celular padronizada e os experimentos foram mantidos em incubadora rotatória (Nova Técnica, Incubadora Shaker Refrigerada NT 715, Brasil) sob rotação de 100 rpm e temperatura controlada de 28 °C, durante 24 e 48 horas.

1.2.3 Extração de extrato bruto enzimático

A extração do extrato bruto enzimático foi realizada adicionando 0.5 mL.g⁻¹ de água destilada ao meio de fermentação. O meio de cultivo foi centrifugado (centrífuga Heraeus Megafuge, 16 R, Canadá) a 4°C, 3500 x g durante 15 minutos para a precipitação da massa celular, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

1.2.4 Atividade pectinolítica total

O meio reacional foi composto por 150 µL de solução de pectina cítrica (0,5 %) como substrato, 150 µL de água destilada e 300 µL do complexo enzimático, de acordo com Santi, (2005) adaptado. A reação ocorreu a 35 °C, durante 7 minutos, e foi paralisada pela adição de ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS), método proposto originalmente por Miller (1959), utilizando ácido monogalacturônico como padrão. Para determinação da concentração de açúcares redutores liberada pela reação, a absorvância final foi avaliada em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 2700, Japão) a 540 nm. Uma unidade de pectinase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido monogalacturônico por minuto, por mL (UENOJO E PASTORE, 2006). Calculada de acordo com a Equação 1. Os ensaios referentes as atividade enzimática foram efetuados em triplicata e analisados por análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey-Kramer, de comparação múltipla, com nível de significância de 95%.

$$([A.M] * V_r) / (V_{\text{extrato enzimático}} * t * MM) = \quad U/mL [1]$$

Onde,

[A.M] = concentração de ácido monolacturônico (mg/mL);

V_r = volume da reação (mL);

V_{extrato} = volume de extrato bruto enzimático (mL);

t = tempo da reação (minutos);

MM = peso molecular açúcar redutor (mg/ µmol).

1.2.5 Meio contendo FRM

Utilizou-se FRM comercial em como única fonte de carbono nas proporções de 0,001 e 0,01 g/mL e água destilada (pH 7,0). A partir da levedura 38 e 63, foram preparadas suspensões padronizadas (BARBOSA, 2013) e 0,1 mL.g⁻¹ de suspensão celular foram inoculadas a cada experimento, que foram mantidos em incubadora rotatória (Nova Técnica, Incubadora Shaker Refrigerada NT 715, Brasil) sob rotação de 100 rpm e temperatura controlada de 28 °C, durante 24 e 48 horas. Foi feita a extração do extrato bruto enzimático de acordo com 1.1.3 e quantificada a atividade pectinolítica total de acordo com 1.1.4, os ensaios de cada avaliação de atividade pectinolítica total de cada cepa, foram efetuados em triplicata e avaliados por análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey-Kramer, de comparação múltipla, com nível de significância de 95%.

1.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *S. CEREVISIAE*

Análise das variáveis, pH, temperatura, agitação e teor de substrato e peptona. Análise estatística do fatorial incompleto, DCCR1 e DCCR2.

1.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO SUCO DE CUPUAÇU

Análise de turbidez, rendimento, cor e viscosidade.

2.RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2 CURVA PADRÃO DE DNS

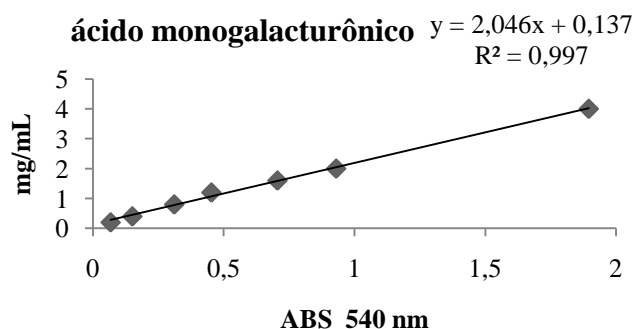


Figura 13. Curva padrão de ácido monogalacturônico com DNS

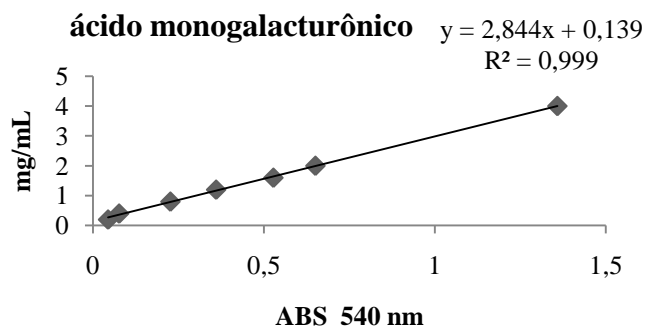


Figura 14. Curva padrão de ácido monogalacturônico com DNS

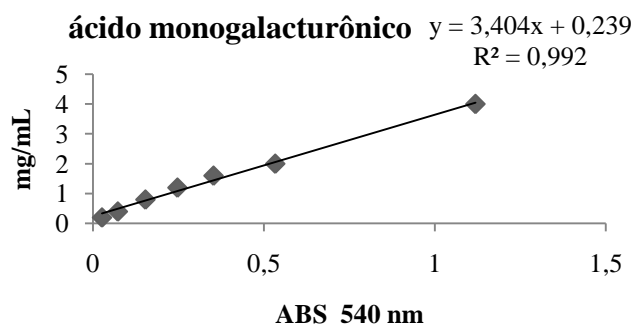


Figura 15. Curva padrão de ácido monogalacturônico com DNS

2.3 CURVA PADRÃO DE AZUL DE BROMOTIMOL

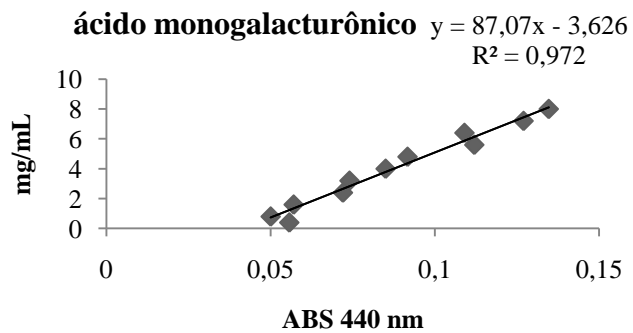


Figura 16. Curva padrão de ácido monogalacturônico com azul de bromotimol

2.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS

2.4.1 Seleção de leveduras, a partir do meio indutor

Tabela 12. Atividade enzimática com o meio mínimo

	U/mL	
Linagem	24 horas	48 horas
38	1,747 ± 0,034 a	0,129 ± 0,111 a
41	1,370 ± 0,045 a,b	0,159 ± 0,138 b
63	1,595 ± 0,246 b	0,194 ± 0,143 a,c
67	0,925 ± 0,053 a,b	0,190 ± 0,093 a,d

As letras (a, b, c e d) indicam a igualdade estatística dos dados com $p > 0,05$

A partir da tabela 13, observa-se que a linhagem 38 e 63 proporcionaram maior atividade enzimática comparado as demais linhagem, com respectivamente 1,747 e 1,595 U/mL em 24 horas. Em 48 horas, o resultado foi significativamente mais baixo, a menor atividade, bem como a maior diferença de atividade enzimática entre 24 e 48h foi observada para a linhagem 38, alcançando atividade enzimática de 0,129 U/mL.

2.4.2 Seleção de leveduras com o meio composto por FRM

Tabela 13. Resultado U/mL para cada linhagem de *S. cerevisiae* – FRM, em 24h de fermentação

	U/mL	
Linagem	0,001 g/mL de farinha	0,01g/mL de farinha
38	0,692± 0,062 a	1,258± 0,119 a,b,c
63	0,696± 0,1 b	0,779 ± 0, 080 c

As letras (a, b, c) indicam a igualdade estatística dos dados com $p > 0,05$

Com a proporção de farinha a 0,001 g/mL ambas as linhagens apresentaram atividades muito próximas, sendo que, a linhagem 63 apresentou uma atividade ligeiramente maior. Aumentando 10% na proporção de farinha (0,01 g/mL) a linhagem 38 apresentou um aumento de 82% na atividade enzimática, enquanto a linhagem 63 apresentou um aumento de 12%. A

pré análise mostrou que a produção de enzimas pectinolíticas por *S. cerevisiae* pode ser efetuada a partir de FRM, e a produtividade é bastante alterada de acordo com a variação dos parâmetros de condição da fermentação. O resultado sugere que a produção de pectinases por levedura a partir de FRM em 24 horas de incubação é viável de ser estudada, sendo que a levedura que apresentou melhor performance foi a linhagem 38.

2.5 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *S. CEREVISIAE*

Análise estatística do DCCR1.

Tabela 14. ANOVA DCCR1

	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F 1%
regressão	35,911	6	5,985	5,526	4,01
resíduo	19,496	18	1,083		F 5%
falta de ajuste	19,301	10			2,77
erro puro	0,196	2			F 10%
TOTAL	55,407	16			2,13

Os resultados de atividade enzimática obtidos possui um grau de confiança elevado de 99 %, a qualidade do ajuste do modelo de regressão foi de $r^2 = 0,69$.

A figura 5. Mostrou que o teor de peptona não teve influência significativa para a resposta.

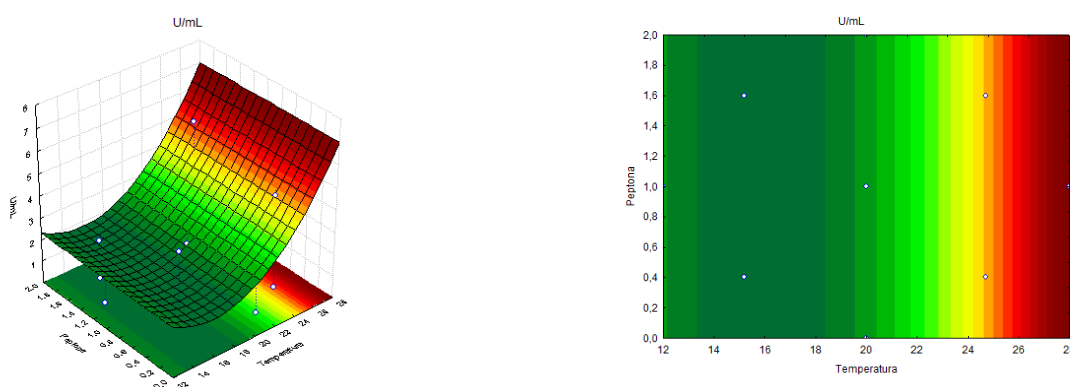


Figura 17. Influência das variáveis “temperatura de incubação (°C)” e “teor de peptona” na atividade pectinolítica total. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.

Tabela 15. ANOVA DCCR2

	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F 1%
Regressão	38,088	7	5,441	11,539	4,64
Resíduo	5,658	12	0,472		F 5%
falta de ajuste	4,09171	3			2,91
erro puro	1,56668	2			F 10%
TOTAL	43,7461	10			2,28

Os resultados de atividade enzimática obtidos possui um grau de confiança elevado de 99 %, a qualidade do ajuste do modelo de regressão foi de $r^2 = 0,87$.

2.7 Tratamento enzimático do suco de cupuaçu

2.6.1 Turbidez

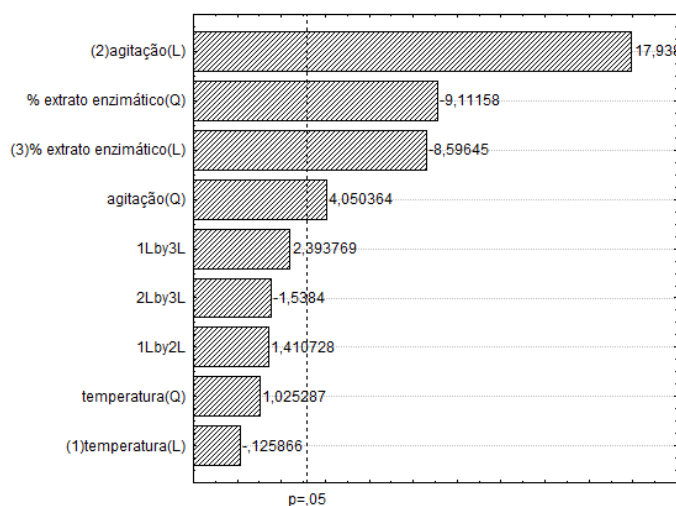


Figura 18. gráfico de pareto turbidez, $p > 0,05$.

A partir da figura 18, nota-se que a variável de maior influência para a turbidez foi a agitação relação linear, seguida da concentração de enzima, seguido de teor de extrato enzimático relação quadrada depois linear, e agitação relação quadrática.

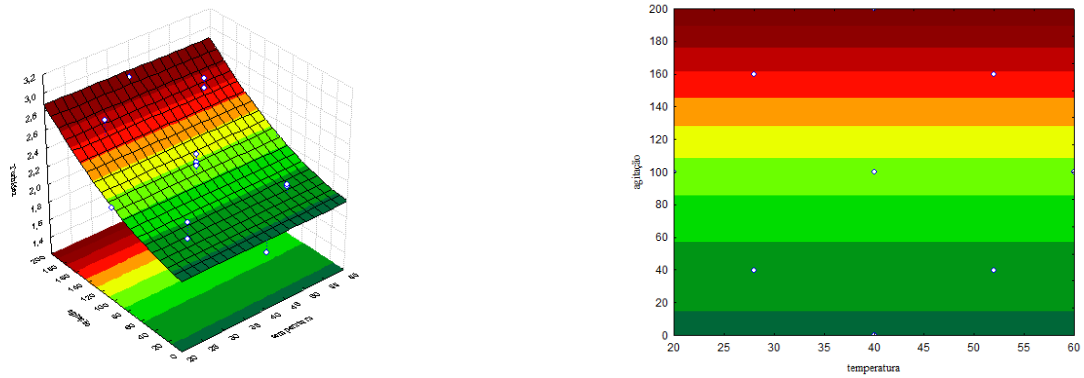


Figura 19. Influência das variáveis “temperatura de reação (°C)” e “agitação” no incremento da turbidez (Abs a 590nm) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.

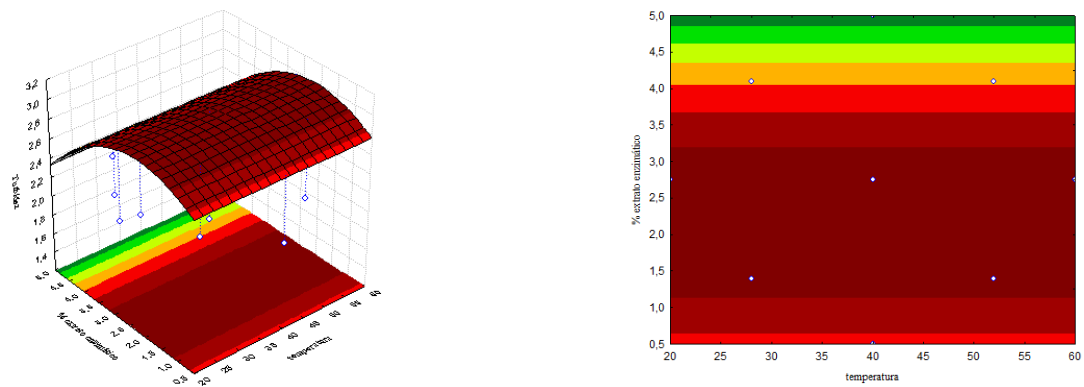


Figura 20. Influência das variáveis “temperatura de reação (°C)” e “teor de extrato bruto enzimático (%)” na turbidez (Abs a 590nm) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta.

A partir da figura 19 e 20 fica exposto que a temperatura não influencia na turbidez.

Tabela 16. ANOVA referente a turbidez

	Turbidez				F tabelado
	SQ	GL	MQ	F	F 1%
regressão	1,587	7	0,23	9,949	3,84
resíduo	0,456	20	0,023		F 5%
falta de ajuste	0,447	10			2,58
erro puro	0,0097	3			F 10%
TOTAL	2,043	17			2,08

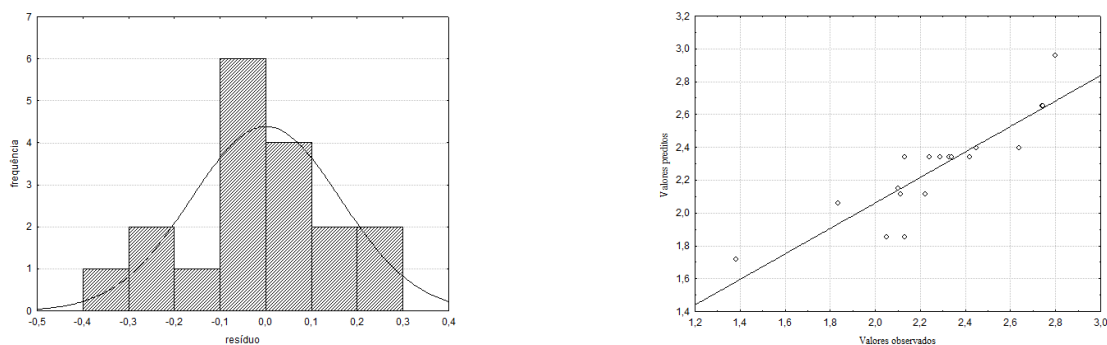


Figura 21. Resíduos referente aos resultados de Turbidez Histograma de erros e B) Abs predito x Abs Observados

A tabela 16, e a figura 21 confirmam a qualidade do ajuste do modelo de regressão baseada no valor do coeficiente de regressão, que explica 78% da variabilidade na resposta, mostrando um bom ajuste entre as respostas observadas e previstas.

2.6.2 Cor

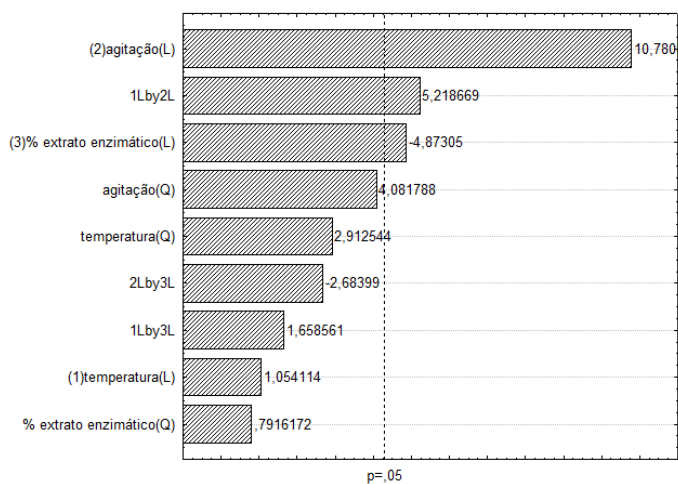


Figura 22. Gráfico de pareto da variável cor

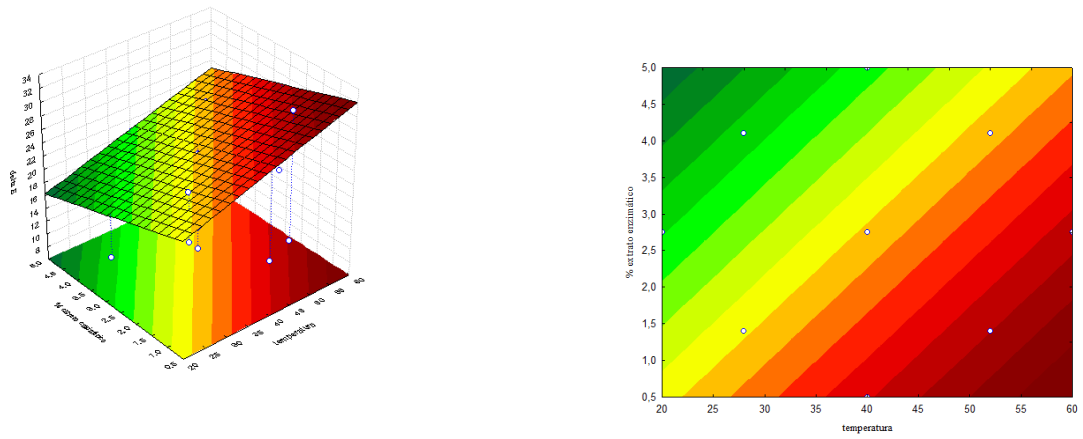


Figura 23. Influência das variáveis “extrato bruto enzimático (%)” e “temperatura de reação (°C)” diferença da cor (ΔE) de suco de cupuaçu. A) Curvas de contorno e B) Superfície de resposta

Tabela 17. Análise estatística ANOVA dos resultados da cor

	SQ	GL	MQ	F	F tabelado
Regressão	460,456	5	92,091	10,389	F 1%
Resíduo	159,558	18	8,864		F 5%
Falta de ajuste	154,051	11			2,77
Erro puro	5,508	2			F 10%
TOTAL	620,015	16			2,2

2.6.3 Rendimento

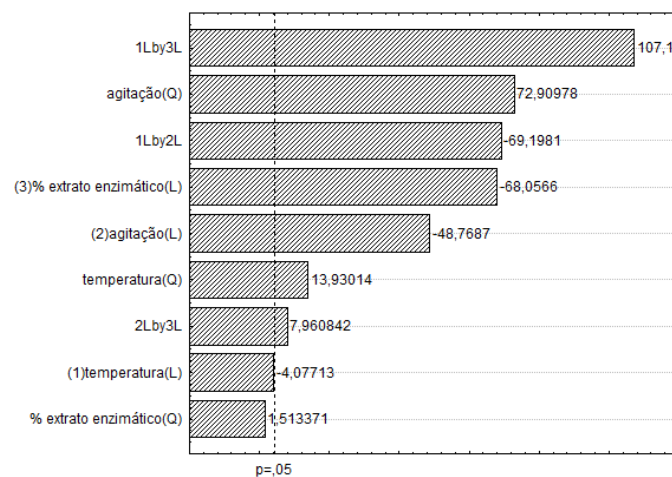


Figura 24. Gráfico de pareto da variável rendimento

Tabela 18. Análise estatística ANOVA dos resultados do rendimento

	SQ	GL	MQ	F	F tabelado
Regressão	4,209	10,	0,421	2,633	F 1% 3,51
Resíduo	2,878	18	0,160		F 5%
Falta de ajuste	2,878	6			2,41
Erro puro	0,000	2			F 10%
TOTAL	7,087	16			1,98

De acordo com a tabela 18. F foi significativo em 95 % porém o coeficiente de regressão r^2 foi baixo. Isso indica que há influência significativa das variáveis testadas na resposta “rendimento”, porém essa influência não é bem explicada pelo modelo matemático gerado. Dessa forma, não é indicado usar nem as superfícies de resposta nem a equação, pode-se usar os dados de influência das variáveis.

2.6.4 Viscosidade

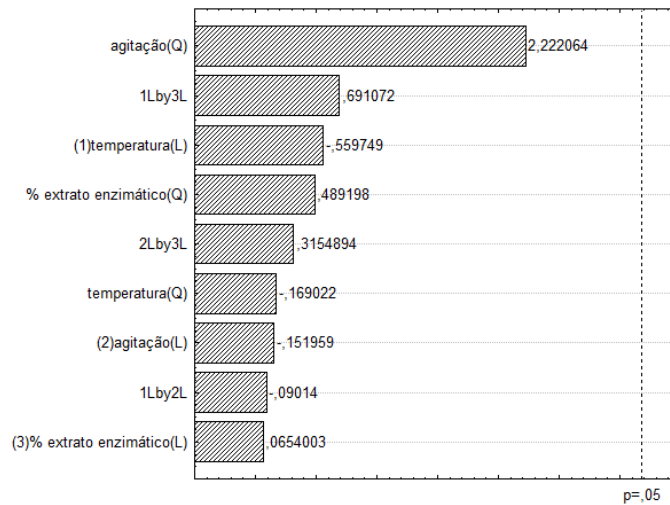


Figura 25. Gráfico de pareto da variável viscosidade

A partir da figura 25, observa-se que nenhuma variável independente influenciou significativamente na viscosidade, contudo não é indicado usar as análises estatísticas.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- BARBOSA, C. D. **Obtenção e caracterização de vinho e vinagre de manga (*Mangifera indica* L.): parâmetros cinéticos das fermentações alcoólica e acética.** 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2013.
- FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste and Biomass Valorization.** v.1, n.1, p.65 – 76, 2010.
- GARG, G. A. S.; KAUR, A. R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotechnology.** v. 6, n.1, p. 47, 2016.
- Grand view research. **Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater, Research & Biotechnology, Diagnostics, Biocatalyst) And Segment Forecasts To 2024.** Junho 2016. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> > Acesso em 5 de agosto de 2016.
- IBISWorld Industry. **Global Fruit & Vegetables Processing.** Abril, 2016. Disponível em: <[file:///C:/Users/User%20W7/Downloads/C1112-GL%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/User%20W7/Downloads/C1112-GL%20(1).pdf)>. Acesso em 7 de agosto de 2016.
- JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: Prospects and perspectives. **Bioresource Technology.** v.176, p. 273 – 283, 2015.
- KUMAR, S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. **Advances in Applied Science Research.** v.6, n.6, p.114 - 124, 2015.
- MALLER, A.; DAMÁSIO, A. L. R.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZEL, M. L. T. M. Biotechnological Potential of AgroIndustrial Wastes as a Carbon Source to Thermostable Polygalacturonase Production in *Aspergillus niveus*. **Enzyme Research.** v. 2011, p. 1-6, 2011.
- Markets and Markets. **Food Enzymes Market worth 2.94 Billion USD by 2021.** Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/industrial-enzymes.asp>>%20e%20(<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/food-and-beverage-enzymes.asp>>. Acesso em: 05 de julho de 2016c.
- Markets and Markets. Setembro, 2016. **Fruit And Vegetable Juice Market: Global Trends, Forecasts & Market Estimates up to 2018.** Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/fruit-vegetable-juice-market-999.html>>. Acesso em 7 de agosto 2016d.
- MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. **Biotechnology Research International.** p. 7, 2013.
- POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM. R.; OBULAM, A. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** v.4, p.70 - 76, 2015.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico, Lajeado**. v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SHARMA, H, P.; PATEL, H.; SHARMA, S. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits-A review. **Food Science and Nutrition**. v.2, n.1, p. 1 - 14, 2014.

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**. v.21, n.2, p.447 – 453, 2014.

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

CONCLUSÕES

As pectinases são enzimas em crescimento no setor tecnológico, mostrando aumento gradual no mercado. Elas detêm uma posição de liderança entre as enzimas industriais produzidas. Devido a sua importância são estudadas novas técnicas de sua produção e de suas aplicações.

O estudo realizado validou a hipótese do aproveitamento da farinha de resíduo de maracujá para a produção de pectinases por *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando-se ser um potencial substrato. Oferecendo uma alternativa para o emprego de um resíduo, que requer demanda por sua utilidade, na produção de um produto de alto valor agregado, as enzimas.

As enzimas pectinolíticas produzidas por *S. cerevisiae* apresentaram alta estabilidade térmica e em distintos valores de pH, o que facilita e possibilita sua aplicação em variados processos, tornando o custo do processo eficaz. No estudo especificamente avaliou-se a extração de suco de polpa de cupuaçu, no qual, apresentou altos rendimentos, mostrando-se ser um processo eficiente.

Este estudo traz um ganho a tecnologia de alimentos, pois além de produzir uma enzima estável por um longo período de tempo, o seu custo e eficácia de produção, e a relação custo benefício, apresentou ser um processo viável. Além disso, a aplicação da enzima em frutos tropicais é uma contribuição interessante para o Brasil, oferecendo um produto tecnológico nacional que pode servir de fonte economicamente viável. A pesquisa apresenta um processo atrativo para futuras implementações em escala industrial.