



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

PRODUÇÃO DE PECTINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM PALMA COMO SUBSTRATO PARA APLICAÇÃO EM SUCO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)

Silvania Lopes da SILVA^{1*}; Monique Silveira RAMOS¹; Jabson Meneses TEIXEIRA²; Abdias Batista da Silva NETO³; Matheus Firmino JARDIM¹; Nívio Batista SANTANA⁴

¹Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos, UESB, Departamento de Tecnologia Rural e Animal; ²Doutorando em Biotecnologia, UFBA/RENORBIO, ICS; ³Doutorando em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, UESC, DCB; ⁴Docente/pesquisador, UESB, Departamento de Tecnologia Rural e Animal.

*E-mail para contato: silvanialopes157@gmail.com

RESUMO – Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos estudos que relatam a utilização da palma como matéria-prima para produção de enzimas. As pectinas são polissacarídeos responsáveis pela turbidez dos sucos de frutas, impactando negativamente na sua qualidade. Assim, as pectinases surgem como uma alternativa eficaz na melhoria das propriedades dos sucos. Para a fermentação em estado sólido foi utilizado a palma IPA Sertaneja (*Opuntia fícus*) como substrato na obtenção de pectinase por *Penicillium roqueforti*. A atividade da enzima foi determinada usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico. Após isso, o extrato enzimático foi aplicado no suco de cupuaçu sob três concentrações de extrato enzimático (1,5%, 3,5% e 5,5%; v/v), além do suco sem tratamento (controle). Os resultados revelam que o tratamento com 5,5% de enzima resultou em uma redução máxima de viscosidade de 73,49%. Os tratamentos 1,5% e 5,5% tiveram um aumento na clarificação de 71,27% e 62,81%, respectivamente. O suco submetido a 5,5% de extrato apresentou um aumento do rendimento de 26,63% em relação ao controle. Desse modo, os resultados mostraram que a pectinase de *P. roqueforti* tem afinidade pela pectina do suco de cupuaçu, tornando-a interessante para aplicação em processos industriais, como viscosidade, clareza e aumento do rendimento de suco.

Palavras-chave: Enzimas; Biotecnologia; Pectina.

PRODUCTION OF PECTINASE BY SOLID STATE FERMENTATION WITH PALM AS SUBSTRATE FOR APPLICATION IN CUPUAÇU JUICE (*Theobroma grandiflorum*)

ABSTRACT – In recent years, studies have been developed reporting the use of palm as a raw material for enzyme production. Pectins are polysaccharides responsible for the turbidity of fruit juices, negatively impacting their quality. Thus, pectinases emerge as an effective

*alternative for improving the properties of juices. For solid-state fermentation, IPA Sertaneja palm (*Opuntia ficus*) was used as a substrate to obtain pectinase by *Penicillium roqueforti*. The enzyme activity was determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid method. Afterwards, the enzyme extract was applied to cupuaçu juice under three concentrations of enzyme extract (1.5%, 3.5% and 5.5%; v/v), in addition to the untreated juice (control). The results reveal that treatment with 5.5% enzyme resulted in a maximum viscosity reduction of 73.49%. The 1.5% and 5.5% treatments showed an increase in clarification of 71.27% and 62.81%, respectively. The juice subjected to 5.5% extract showed an increase in yield of 26.63% compared to the control. Thus, the results showed that the pectinase from *P. roqueforti* has affinity for the pectin in cupuaçu juice, making it interesting for application in industrial processes, such as viscosity, clarity and increased juice yield.*

Keywords: Enzymes; Biotechnology; Pectin.

1. INTRODUÇÃO

A família Cactaceae é amplamente distribuída, encontrada do Canadá, nos EUA, México e América Central e do Sul. (Araújo et al., 2021). A palma (*Opuntia ficus-indica*), pertencente a essa família possui mecanismos fisiológicos que permitem sua adaptação às condições climáticas, com alta eficiência no uso da água, apresenta grande produtividade de biomassa rica em nutrientes digestíveis de alto valor, como carboidratos, fibrosos ou não fibrosos. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos estudos que relatam a utilização da palma como matéria-prima para produção de enzimas (Neves et al., 2022).

As pectinas, que são polissacarídeos presentes nas paredes celulares das plantas, são responsáveis pela turbidez dos sucos de frutas, impactando negativamente sua qualidade e valor nutricional. Desse modo, a clarificação dos sucos é essencial na indústria, pois visa remover a pectina para aprimorar o sabor, a aparência, a textura e a comercialização do produto (Bentouhami et al., 2024).

Os métodos tradicionais, como centrifugação e filtração, apresentam algumas limitações, como a presença de moléculas menores, baixa recuperação do suco, ineficiência, processos longos e alterações no aroma, sabor e cor, o que pode tornar os produtos finais menos desejáveis (Ezugwu et al., 2023).

Neste contexto, as pectinases surgem como uma alternativa eficaz para solucionar essas desvantagens, acompanhadas de métodos químicos e físicos de clarificação de suco. A pectinase atua na hidrólise das pectinas, convertendo-as em ácido galacturônico mais solúvel, reduzindo assim a turbidez e a viscosidade do suco. Além disso, o uso de pectinase na clarificação de sucos é sustentável, ecologicamente correto e são valiosas para produzir uma ampla gama de produtos de alta qualidade (Bentouhami et al., 2024; Ezugwu et al., 2023).

Enzimas pectinolíticas de fontes microbiológicas por fermentação têm despertado interesse crescente, devido à sua disponibilidade de produção consistente. As pectinases comerciais são produzidas principalmente por fungos por fermentação em estado sólido. As cepas fúngicas são amplamente utilizadas na produção de pectinase devido à sua alta capacidade de crescimento, custo-benefício, escalabilidade, baixas necessidades nutricionais e facilidade de manipulação genética (Núñez-Serrano et al., 2024).

Portanto, com foco nas aplicações de enzimas pectinolíticas específicas para clarificação



“Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos”

de sucos, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando a palma e investigar o efeito do extrato enzimático nas propriedades do suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação do Substrato

A palma IPA Sertaneja (*Opuntia fícus*) foi fornecida pelo campo agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Juvino Oliveira, Itapetinga, Bahia. As palmas foram cortadas em pedaços pequenos e secos em estufa (FANEM, modelo 320-SE, São Paulo) a 65 °C por 96 horas. Em seguida, o material seco foi triturado em moinho de facas (ACB Labor, São Paulo, Brasil) até a granulometria de 2 mm e armazenado em saco plástico fechado, em local seco, até o uso.

2.2 Microrganismo

O fungo *Penicillium roqueforti* foi obtido da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), sob registro número 40074 e lote 041140074. A cultura do fungo foi preservada periodicamente com sílica gel e mantida a 5 °C.

2.3 Preparação do Inóculo

A suspensão de esporos foi realizada utilizando o microrganismo cultivado no meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) (Himedia®) e ágar-ágar (Dinâmica®) em Erlenmeyer de 500 mL durante 7 dias a 25 °C em estufa bacteriológica (De Leo, Porto Alegre, Brasil). Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida à raspagem com auxílio de esferas de vidro e a suspensão coleta em tubo Falcon. Uma alíquota de 0,1 mL foi diluída em tubo de ensaio para contagem no número de esporos em microscópio binocular em câmara de Neubauer (Bioval).

2.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A FES foi realizada conforme metodologia descrita por Araújo et al. (2021). Frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 5g de palma foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos em autoclave (Primatec, São Paulo, Brasil). Após resfriamento, as amostras foram inoculadas com uma concentração de 10^7 esporos mL⁻¹ e a umidade ajustada para 70% com água destilada estéril. Os experimentos foram incubados em estufa bacteriológica (De Leo, Porto Alegre, Brasil) a 27 °C por 144 horas.

2.5 Obtenção do Extrato Enzimático

Para obtenção do extrato, um volume de 5 mL/g do resíduo de água estéril foi adicionado aos frascos e agitados a 150 rpm em incubadora orbital (Solab, São Paulo, Brasil) por 30 min a 25 °C. A fase líquida foi separada por prensagem mecânica. Logo após, o extrato enzimático

bruto foi centrifugado (Cientec, São Paulo, Brasil) a 6.000 rpm por 15 min, e os sobrenadantes foram recuperados, obtendo assim o extrato enzimático.

2.6 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da enzima pectinase foi determinada através da liberação de ácido galacturônico da pectina usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (ACS[®] Científica), conforme descrito por Miller, (1959). O ensaio foi conduzido com 125µL de extrato bruto e 125µL mL de pectina cítrica a 1% (p/v) (ACS[®] Científica) preparada em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,5). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 40 °C em banho Maria (SOLAB SL 150, São Paulo, Brasil). Após esse período, adicionou-se 250µL de DNS e a mistura foi incubada em banho maria (Cientec, São Paulo, Brasil) a 100 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida em banho de gelo. Após o resfriamento, foi adicionado 2,5 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SP 2000 UV) a 540 nm A atividade da pectinase foi obtida conforme a equação 1.

$$\text{Atividade enzimática (U/g)} = (X \cdot D / T \cdot A) / (F) \quad (1)$$

Onde: X = Concentração de açúcares redutores; D = Diluição da amostra; T = Tempo de reação; A = Ajuste da câmara; F = Fator da curva de glicose.

2.7 Aplicação do Extrato Enzimático

2.7.1 Preparação do Suco de Cupuaçu

Os frutos de cupuaçu foram adquiridos em uma fazenda localizada na cidade de Ilhéus, Bahia. Para o processo, frutos selecionados foram lavados em água corrente, cortados e despulpados em despulpadeira, as polpas foram congeladas a -18 °C até o uso.

Após isso, a polpa foi diluída na proporção 1:1 (polpa:água; v/v), homogeneizada e pasteurizada a 85 °C em banho maria (Cientec, São Paulo, Brasil) por 5 minutos e resfriada até 45 °C. Em seguida, o suco foi submetido a três concentrações de extrato enzimático (1,5%, 3,5% e 5,5%; v/v) e um suco sem tratamento foi mantido como controle. Os experimentos foram incubados em agitação constante a 150 rpm por 120 minutos a 50°C. Ao final, a enzima foi rapidamente inativada em banho maria à temperatura de 95 °C por 5 min. Em seguida, os tratamentos foram resfriados, centrifugados a 6.000 rpm, durante 15 minutos a 5 °C e filtrados em peneira de malha 0,02 mm para obtenção do suco (Santana et al., (2023).

2.7.2 Rendimento

O rendimento do suco foi estimado em porcentagem do suco clarificado obtido com base no peso inicial do suco de acordo com a equação 2.

$$\text{Rendimento do suco (\%)} = \frac{\text{Peso do suco clarificado}}{\text{Peso inicial do suco}} \times 100 \quad (2)$$



“Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos”

2.7.3 Clareza

A clareza do suco de cupuaçu foi determinada de acordo com Núñez-Serrano et al. (2024) usando um espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SP 2000 UV) a 660 nm, tomando o suco sem o tratamento enzimático como 100%.

2.7.4 Sólidos Solúveis Totais

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado usando um refratômetro analógico (Brewparts, Modelo 17925) que foi calibrado usando água destilada e expresso como % Brix.

2.7.5 Viscosidade

A viscosidade foi medida usando um viscosímetro (Brookfield Engineering Laboratories, Modelo D 220, EUA) a 90 rpm com Spindle SC4-18 a 25 °C, segundo Santana et al. (2023). Os valores foram expressos como porcentagem de redução da viscosidade do suco em comparação ao controle (sem tratamento enzimático).

2.8 Análise Estatística

O experimento foi conduzido com 3 repetições e em triplicata. O nível de significância estatística foi avaliado por análise de variância (ANOVA). Para os modelos significativos, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a um nível de 95% de significância ($<0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade Enzimática

Os resultados revelam que *P. Roqueforti* demonstrou atividade pectinase significativa de 17 U/g após 144 h de incubação a 25 °C usando a palma como substrato. De acordo Silva et al. (2023) a produção de pectinase por *P. roqueforti* tem sido amplamente estudada devido as suas condições favoráveis para fermentação em estado sólido e principalmente por ser reconhecido como seguro (GRAS).

3.2 Aplicação do Extrato Enzimático

Os valores experimentais da redução de viscosidade, clareza, rendimento e sólidos solúveis sob diferentes condições de tratamento são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Valores médios dos parâmetros analisados em suco de cupuaçu sob diferentes concentrações do extrato enzimático por *Penicillium roqueforti*.

Concentração de enzima (%)	Redução de viscosidade (%)	Clareza (%)	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (% brix)
Controle	-	-	64,09 ± 0,41 ^d	5,20 ± 0,00 ^a
1,5%	39,87 ± 0,01 ^c	65,04a ± 6,8 ^a	69,56 ± 0,03 ^c	5,19 ± 0,01 ^a
3,5%	68,28 ± 0,34 ^b	28,73 ± 1,12 ^b	76,88 ± 0,93 ^b	5,19 ± 0,01 ^a
5,5%	73,49 ± 0,26 ^a	37,25 ± 0,14 ^b	81,16 ± 0,01 ^a	5,19 ± 0,01 ^a

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de média de Tukey.

Os dados deste estudo indicam que a viscosidade do suco de cupuaçu foi significativamente influenciada pela concentração dos extratos enzimáticos (% v/v). O tratamento com 5,5% de enzima resultou em uma redução de viscosidade de 73,49%. Isso acontece, pois as enzimas pectinolíticas degradam as moléculas de pectina presentes nos sucos e reduzem a viscosidade.

A viscosidade é um parâmetro importante na fabricação de sucos, pois afeta o fluxo nos equipamentos. Frutas ricas em pectina e celulose tendem a produzir sucos mais espessos e turvos, já que essas substâncias, junto com outros polissacarídeos ligados às paredes celulares, acabam sendo arrastadas no processo (Santana et al., 2023). Assim, o uso de enzimas no tratamento de sucos de frutas reduz a viscosidade do suco e melhora a qualidade da polpa, ao desintegrar a estrutura celular (Santana et al., 2021).

É visto que houve uma redução na clareza, os tratamentos 1,5% e 5,5% tiveram um aumento na clarificação de 71,27% e 62,81%, respectivamente. A diferença na clareza do suco pode ser resultado da hidrólise do conteúdo de pectina no suco de cupuaçu pela pectinase bruta, resultando em uma redução na turbidez (Azfia et al., 2024).

O suco clarificado também obteve rendimentos significativos conforme aumentou a concentração de enzima. O tratamento com 5,5% de enzima apresentou um aumento do rendimento de 26,63% em relação ao tratamento controle. Isso ocorre, pois, a quebra por enzimas pectinolíticas e outras ligações complexas que formam a polpa e os produtos com polpa liberam água na forma de suco, aumentando o rendimento (Santana et al., 2023).

Em relação aos parâmetros sólidos solúveis os resultados revelam que não houve diferença estatística entre as condições estudadas. No entanto, a aplicação do extrato bruto contendo pectinase de *P. roqueforti* foi capaz de hidrolisar moléculas de pectina e de outros polissacarídeos, melhorando a viscosidade, clarificação e aumentando o rendimento.

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a pectinase de *P. roqueforti* tem afinidade pela pectina do suco de cupuaçu, tornando-a interessante para aplicação em processos industriais, como viscosidade, clareza e aumento do rendimento de suco. Dessa forma, o propósito de melhorar as propriedades do suco de cupuaçu usando a pectinase bruta é alcançado. Assim, pode-se dizer



“Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos”

que *P. roqueforti* é um produtor eficiente de pectinase com atividade e eficiência para ser aplicado em suco de cupuaçu.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

AFZIA, N., SHILL, N., KALITA, B.J., SIT, N. Optimization of conditions for production of pectinase in solid-state fermentation with *Aspergillus flavus* using dried Assam lemon peel powder as substrate. **Measurement: Food**, v. 14, p. 100166, 2024

AMIN, F., MOHSIN, A., BHATTI, H.N., BILAL, M. Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1868 (5), p. 140379, 2020.

ARAÚJO, D.F.D.S., OLIVEIRA, M.E.G., CARVALHO, P.O.A.A., TAVARES, E.D.A., GUERRA, G.C.B., QUEIROGA, R.D.C.R.E., BEZERRIL, F. F., MARTINS, A. C. S., MEDEIROS, G. K.V.V., MACHADO, T.A.D.G., MELO, N.M.D.C. Food plants in the Caatinga. **In Local Food Plants of Brazil**. p. 225-250, 2021.

ARAÚJO, S.C., RAMOS, M.R.M.F., ESPÍRITO SANTO, E.L., MENEZES, L.H.S., CARVALHO, M.S., TAVARES, I.M.C., FRANCO, M., OLIVEIRA, J.R. Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through solid-state fermentation using agro-industrial residue based on a univariate analysis. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 52(3), p. 325-330, 2022.

BENTOUHAMI, N.E., ASEHRAOU, A., MECHRI, S., HASNAOUI, I., MOUMNASSI, S., YAHYAOU, M.I., BRAHMI, F., TAIBI, M., BELLAOUCHI, R., FIRDAOUS, L., SAALAOUI, E., JAOUADI, B. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* strain HO32 and its suitability for clarification of orange juice. **Process Biochemistry**, v. 145, p. 63-73, 2024.

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

NEVES, C.A., MENEZES, L.H.S., SOARES, G.A., REIS, N.S., TAVARES, I.M.C., FRANCO, M., OLIVEIRA, J.R. Production and biochemical characterization of halotolerant β -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12 (8), p. 3133–3144, 2022.

NÚÑEZ-SERRANO, A., GARCÍA-REYES, R.B., SOLÍS-PEREIRA, S., GARCÍA-GONZÁLEZ, A. Production and immobilization of pectinases from *Penicillium crustosum* in magnetic core-shell nanostructures for juice clarification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 263, p. 130268, 2024.

SANTANA, M.L., BISPO, J.A.C., SENA, A.R., TESHIMA, E., BRITO, A.R., COSTA, F.S., FRANCO, M., ASSIS, S.A. Clarification of tangerine juice using cellulases from *Pseudomyces* sp. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 44-51, 2021.

SANTANA, M.L., TAVARES, I.M.D.C., COSTA, F.S., TESHIMA, E., SENA, A.R.,



“Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos”

FRANCO, M., ASSIS, S.A. The improvement of guava (*Psidium guajava*) juice quality using crude multi-enzymatic extracts obtained from yeasts. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 70 (3), p. 1310-1319, 2023.

SILVA, T.P., ARAÚJO, S.C., ESPÍRITO SANTO, E.L., GONÇALVES, M.S., SAMPAIO, I.C.F., PEREIRA, H.J.V., IRFAN, M., FERREIRA, L.O., SILVA, E.G.P., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. From byproducts to bioresources: cocoa shell solid-state fermentation lipase as a low-cost esterification catalyst. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-11, 2024.