



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**Caracterização Bioquímica das pectinases produzidas pelos fungos
Aspergillus japonicus e *Aspergillus* sp. M1 e sua aplicação na
clarificação da polpa de manga**

Nathalia Nunes Glienke

Orientação: Prof^a. Dra. Giovana Cristina Giannesi

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Campo Grande, MS

Novembro de 2021

2. Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Gerson e Graciela, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditei, sem vocês jamais estaria aqui.

A todos meus amigos, especialmente aos que fiz nesses quatro anos, agradeço por todos os cafés nos intervalos de aula e pós almoço na concha, com certeza minha jornada até aqui foi bem mais leve por isso.

A minha orientadora, Prof^a. Dr.^a Giovana Cristina Giannesi, e Nelciele Cavalieri de Alencar Guimarães, pelas orientações, paciência e ensinamentos durante os últimos anos.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela infraestrutura.

E a todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
1. Introdução	3
2. Objetivos gerais e específicos.....	7
3. Material e Métodos.....	8
3.1. Origem e Manutenção dos microrganismos.....	8
3.2. Produção de pectinase com várias fontes de carbono por <i>A. japonicus</i> e <i>Aspergillus</i> sp. M1.....	8
3.3. Ensaio enzimáticos e proteicos.....	9
3.4. Curva de crescimento para produção de pectinase.....	9
3.5. Influência do pH e temperatura na atividade da pectinase.....	10
3.6. Clarificação de sucos de frutas.....	10
3.7. Análise dos resultados.....	11
4. Resultados.....	12
4.1 Capítulo 1.....	12
4.1.1 Produção de pectinases usando diferentes fontes de carbono.....	12
4.1.2 Curva de crescimento para produção de pectinase.....	13
4.1.3 Influência do pH e temperatura na atividade da pectinase.....	13
4.1.4 Aplicação do extrato bruto de <i>A. japonicus</i> e pectinase comercial (Pectinex) na clarificação de sucos de frutas.....	15
4.2 Capítulo 2.....	17
4.2.1 Produção de pectinases usando diferentes fontes de carbono por <i>Aspergillus</i> sp. M1.....	17
4.2.2 Curva de crescimento para produção de pectinase por <i>Aspergillus</i> sp. M1.....	18
4.2.3 Influência do pH e temperatura na atividade da pectinase de <i>Aspergillus</i> sp. M1....	19
4.2.4 Aplicação do extrato bruto de <i>Aspergillus</i> sp. M1 e pectinase comercial (Pectinex) na clarificação de sucos de frutas.....	21
5. Discussão.....	22
6. Conclusão.....	25
7. Agradecimentos.....	26
8. Referências.....	27

Resumo

As pectinases são um grupo de enzimas capazes de degradar polissacarídeos da parede celular vegetal, facilitando a obtenção da fonte de carbono pelos microrganismos em decorrência da fragmentação celular. Os fungos filamentosos são os mais utilizados para produção enzimática em escala industrial, com aplicação na clarificação de sucos de frutas, dentre estes estão os fungos do gênero *Aspergillus*. O objetivo foi avaliar a produção e caracterizar as pectinases produzidas por *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 a partir de resíduos agroindustriais e aplicar essas enzimas na clarificação de sucos de manga. A produção de pectinase foi avaliada usando diferentes fontes de carbono em meio sólido (2,5 gramas) e os fungos foram inoculados com 10 ml de solução salina com esporos. O tempo ótimo de crescimento foi avaliado usando o resíduo da erva Tereré como fonte de carbono em meio sólido por 192 h em condição estacionária a 35 °C. A atividade enzimática foi medida em temperaturas entre 30 e 70 °C e tampão McIlvaine pH 3 a 7 usando o método DNS. A clarificação do suco por pectinases foi avaliada medindo a transmitância de acordo com Rosmine et al. (2017). *Aspergillus* sp. M1 teve produção ótima em resíduo de erva Tereré após 72h de crescimento e atividade máxima em pH 3 (2,58 U/ml) e 70°C (4,32 U/ml). *A. japonicus* teve produção ótima em resíduo de erva Tereré após 48h e atividade máxima com tampão McIlvaine pH 3 (1,34 U/ml) e a 60 °C (2,16 U / ml). A pectinase de *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 obtiveram resultados máximos na clarificação do suco de manga ‘Palmer’ a 50 °C, com clarificação de 20,1% $\pm$ 1,4 e 22,1% $\pm$ 2,9, respectivamente. Os resultados mostraram que as pectinases de ambos os fungos apresentam características viáveis para aplicação na clarificação de sucos de frutas.

Palavras-chave: pectinases, clarificação de suco de fruta, *Aspergillus* sp.

Abstract

Pectinases are a group of enzymes capable of degrading polysaccharides in the plant cell wall, making it easier for microorganisms to obtain a carbon source as a result of cell fragmentation. Filamentous fungi are the most used for enzymatic production on an industrial scale, with application in the clarification of fruit juices, among these are the fungi of the genus *Aspergillus*. The objective was to evaluate the production and characterize the pectinases produced by *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus* sp. M1 from agro-industrial residues and apply these enzymes in the clarification of mango juices. The production of pectinase was evaluated using different carbon sources in solid medium (2.5 grams) and the fungi were inoculated with 10 ml of saline solution with spores. The optimal growth time was evaluated using Tereré herb residue as a carbon source in solid medium for 192 h in stationary condition at 35 °C. Enzyme activity was measured at temperatures between 30 and 70 °C and McIlvaine buffer pH 3 to 7 using the DNS method. The clarification of the juice by pectinases was evaluated by measuring the transmittance according to Rosmine et al. (2017). *Aspergillus* sp. M1 had optimal production in Tereré herb residue after 72h of growth and maximum activity at pH 3 (2.58 U/ml) and 70°C (4.32 U/ml). *A. japonicus* had optimal production in Tereré grass residue after 48h and maximum activity with McIlvaine buffer pH 3 (1.34 U/ml) and at 60 °C (2.16 U / ml). Pectinase from *A. japonicus* and *Aspergillus* sp. M1 obtained maximum results in the clarification of 'Palmer' mango juice at 50 °C, with a clarification of 20.1% $\pm$ 1.4 and 22.1% $\pm$ 2.9, respectively. The results showed that pectinases from both fungi present viable characteristics for application in the clarification of fruit juices.

Keywords: pectinases, fruit juice clarification, *Aspergillus* sp.

1. Introdução

A aplicação de enzimas nas indústrias tem crescido progressivamente devido a diversas possibilidades de aplicações, alta especificidade, estabilidade e agilidade no processo. Além dessas vantagens, as enzimas apresentam-se também como uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente, se comparadas a opções não biológicas, além de agir em temperaturas e pressões menores, reduzindo também custos, configurando a chamada biotecnologia branca (Cologna et al., 2018). Dentro do mercado mundial de enzimas, destacamos as pectinases que têm um crescimento de cerca de 2,86% ao ano, chegando a 35,5 milhões em 2021 (John et al., 2020). A produção e venda de pectinases representa cerca de 10% do mercado mundial de enzimas, sendo a indústria de alimentos e bebidas o maior consumidor deste mercado (Berger, 2014).

A pectina, é um polissacarídeo presente na lamela média e parede celular primária de cereais, fibras, frutas e vegetais, chegando a compor 1/3 da substância seca destas estruturas em eudicotiledônias (Jarvis et al., 1988), promovendo integridade física e adesão entre células (Kohli & Gupta, 2015). E a degradação deste polissacarídeo ocorre por meio de um grupo de enzimas denominado pectinases, levando à desintegração do tecido, causando modificações visualmente perceptíveis durante o amadurecimento de frutas consequentemente facilitando para que outros organismos obtenham o carbono resultante da fragmentação celular (Polizeli et al., 2014). A pectina tem diversas classificações, partindo da composição de sua cadeia principal, chamada de homogalacturonana. Já suas ramificações podem apresentar principalmente açúcares como ramnose, arabinose, xilose e galactose. Logo, diferentes tipos de pectinases agem sobre este polissacarídeo, como a pectina metil-esterase, reduzindo o grau de esterificação da cadeia principal, permitindo que poligalacturonases (PGases) atuem na região terminal

da homogalacturanana (exo-PG) ou no seu interior (endo-PG). Devido a esta possibilidade de nutrição, inúmeros microrganismos produzem pectinases como parte de seu metabolismo, dentre eles estão bactérias, leveduras, fungos filamentosos, insetos e nematóides. E vários fungos foram catalogados como produtores de pectinases, dentre eles destacam-se: *Botrytis cinera*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* sp., *Rhizoctonia solani*, *Neurospora crassa* e várias espécies de *Aspergillus*, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus foetidus* (Ramadan, 2018, Ruiz et al., 2016).

Segundo o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), a agricultura produz 5 bilhões de toneladas de biomassa anualmente, dentre eles farelo de arroz e de trigo, bagaço de cana de açúcar e frutas. Logo, é relevante a conversão destes resíduos em produtos de interesse industrial e comercial, ajudando inclusive a reduzir seu impacto ambiental (Wang et al., 2016). Estes resíduos agroindustriais apresentam uma alternativa para o cultivo de fungos e sua produção de enzimas, como a pectinase, já que a biomassa representa um habitat natural de degradação (Nighojkar et al., 2019) além de ser uma opção mais econômica (Bharathiraja et al., 2017). Desta maneira, diferentes resíduos usados como fonte de carbono para produção de pectinase são reportados na literatura, como bagaço de cana e laranja, e farelo de trigo com *Thermoascus aurantiacus* (Martins et al., 2002), polpa de limão com *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* e uma mistura de farelo de trigo com bagaço de laranja com *Penicillium viridicatum* (Panesar et al., 2016).

Com isso, a produção de pectinase por fungos a partir de resíduos agroindustriais encontram diversas aplicações em inúmeras indústrias, como extração de óleos vegetais (como óleo de canola, coco, girassol e azeite), tratamento de efluentes de indústrias têxteis e de papel, além de substituir compostos químicos potencialmente prejudiciais ao meio

ambiente no processo de clareamento do papel. Mas suas aplicações se concentram principalmente na indústria alimentícia, sendo usadas na fermentação de chá e café, produção de vinhos e sucos (Polizeli et al., 2014).

Na produção de vinhos e sucos, devido a maior facilidade de produção e diversidade, os fungos filamentosos são os mais utilizados na produção enzimática para uso nas indústrias de alimentos. Ademais, o pH ótimo para a atividade das pectinases provenientes de fungos aproxima-se do pH de sucos comerciais, entre 3 e 5,5 (Berger, 2014), ao contrário das pectinases produzidas por bactérias, que em geral possuem um pH ótimo alcalino, sendo aplicadas por exemplo na indústria têxtil (Ramadan, 2018).

Dentro do contexto de produção industrial de sucos, pectinases são aplicadas sobretudo na clarificação de sucos, onde pode ser combinada com outras enzimas, a fim de reduzir a viscosidade da polpa e conseqüentemente sua turbidez, além de facilitar o processo de filtração (Ramadan, 2018). Tudo isso ocorre por meio da desintegração das cadeias de pectina presentes especialmente na casca das frutas, processo que se inicia com a maceração da fruta até um estado quase liquefeito, diminuindo o tempo da reação e aumentando a extração de compostos importantes. Em seguida, pectinases são usadas para a clarificação, melhorando a filtração, estabilidade e qualidade do produto final (Polizeli et al., 2014).

Com isso, pectinases já foram aplicadas na clarificação de diversos sucos de interesse comercial, como suco de maçã usando enzimas produzidas pelo gênero *Aspergillus* (Joshi et al., 2011), chegando a uma redução de até 90% da turbidez com pectinases de *Aspergillus niger* (Kant et al., 2013, Sandri et al., 2013). Sucos de manga (Kumar et al., 2012) e algumas frutas cítricas, como laranja e limão também obtiveram bons resultados. Diaz et al. (2013) relataram uma clarificação de cerca de 95% em suco de laranja por uma combinação de pectinase e xilanase de *A. awamori*. *Aspergillus tubingensis* foi reportado

na clarificação de suco de abacaxi (Patidar et al., 2016), assim como *A. niger* (Tochi et al., 2009), e pectinase produzida por *Penicillium occitanis* reduziu cerca de 77% da viscosidade e 47% da turbidez de sucos de limão (Maktouf et al., 2014). Portanto, é possível verificar uma grande variedade de aplicações das pectinases na clarificação de diversos sucos.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a produção e caracterizar pectinases produzidas por *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 a partir de resíduos agroindustriais e aplicar estas enzimas no processo de clarificação do suco de manga.

Objetivos específicos

- i. Foram avaliadas as melhores condições para produção de pectinases a partir de diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, tais como: casca de maracujá, casca de laranja extrusada, farelo de trigo, palha de milho, bagaço de cana, erva de tereré, erva de chimarrão, entre outras.
- ii. As melhores fontes de carbono foram usadas para avaliação: do tempo de crescimento, temperatura e pH ótimos.
- iii. Aplicação das enzimas nos processos de clarificação de diferentes polpas de manga.

3. Material e Métodos

3.1. Origem e Manutenção dos microrganismos

Foram selecionados dois fungos filamentosos para este trabalho, sendo o *Aspergillus japonicus* (UFMS 48.136) isolado na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS) – Brasil e o *Aspergillus* sp. M1 isolado de uma maçã dentro do laboratório de bioquímica da UFMS, sendo o gênero identificado pela técnica Clarice Rossato Marchetti da Micoteca da UFMS.

A manutenção dos fungos ocorreu por meio de repiques periódicos a cada 30 dias em ágar dextrose batata inclinado (BDA) mantidos em estufa a 35°C durante 5-7 dias. Depois foram armazenados em geladeira e usados no momento do experimento.

3.2. Produção de pectinase com várias fontes de carbono por *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1

Para a produção de pectinase em meio sólido, os esporos de *Aspergillus* sp. M1 e *A. japonicus* foram ressuspensos em 5 ml de solução de sais contendo (NH₄)₂SO₄ (0,1%) e MgSO₄.7H₂O (0,1%), e colocados em erlenmeyers de 125 ml, cada um contendo 2,5 gramas de fonte de carbono (bagaço de cana, bagaço de cana explodido, casca de maracujá, casca de laranja extrusada, casca de maçã, farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de aveia, farinha de mandioca, erva de tereré, erva de chimarrão, palha de milho, sabugo de milho). O crescimento foi em estufa à 35°C durante 120 horas, conforme previamente padronizado no laboratório.

Após o crescimento em meio sólido, as culturas foram incubadas com 25 ml de água destilada, agitadas durante 30 minutos e filtradas com uma peneira. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para separação do conteúdo sobrenadante, considerado como extrato bruto contendo a enzima (pectinase).

3.3. Ensaio enzimático e proteico

A atividade de pectinase de *A. japonicus* foi determinada por meio da incubação do extrato bruto em tampão acetato de sódio 100mM pH 4, contendo 1% de pectina citrus a 60 °C, conforme previamente padronizado no laboratório. Já para *Aspergillus* sp. M1 foi usado tampão McIlvaine pH 5 com 1% de pectina citrus à 45 °C, parâmetros padrões antes da determinação das melhores condições de atividade enzimática. Após a incubação foram retiradas alíquotas de 0, 10 e 20 minutos, interrompendo a reação em ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com a metodologia de Miller (1959), usando ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições do ensaio.

A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry et al. (1951), usando soroalbumina bovina como padrão. A atividade específica foi determinada usando unidades por miligrama de proteína (U/mg).

3.4. Curva de crescimento para produção de pectinase

A determinação do melhor tempo de crescimento para *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 foi realizada em meio contendo a melhor fonte de carbono entre os resíduos

agroindustriais testados, por um período de 24 a 192 horas a 35 °C. As alíquotas foram retiradas a cada 24 horas e dosadas de acordo com o item 3.3.

3.5. Influência do pH e temperatura na atividade da pectinase

O pH ótimo da pectinase produzida pelos fungos foi determinado incubando as enzimas com tampão McIlvaine contendo pectina citrus 1%, em pHs variando entre 3 e 7.

Já a temperatura ótima foi determinada por meio da incubação das pectinases em temperaturas variando de 30 a 70 °C usando o tampão McIlvaine no pH ótimo.

As atividades relativas foram calculadas como uma percentagem da atividade máxima.

3.6. Clarificação de sucos de frutas

Para os testes de clarificação foram utilizadas polpas de diferentes mangas como: manga espada, manga Haden, manga palmer, manga rosa e manga tommy. As frutas foram descascadas e maceradas usando um liquidificador, obtendo as polpas dos sucos das frutas. As polpas foram incubadas à 50 °C durante 4 horas em agitação (140 rpm), contendo uma concentração 1:1 de extrato bruto.

Ao fim do período de incubação, todas as polpas foram fervidas durante 5 minutos a fim de interromper toda atividade enzimática. Em seguida foram centrifugadas a 16.873 rcf durante 15 minutos e o sobrenadante usado para medir a transmitância a 650nm em espectrofotômetro tomando água destilada como o branco. A polpa de cada fruta não tratada e o extrato bruto fervido (1:1 v/v) foram utilizadas como controle. A clarificação foi calculada da seguinte forma: % de clarificação = $\frac{T_t - T_c}{T_c} \times 100$ (T_t = transmitância do teste; T_c = transmitância do controle) como descrito por Rosmine et al. (2017).

3.7. Análise dos resultados

Todos os experimentos descritos anteriormente foram realizados em triplicata seguindo-se as metodologias pré-estabelecidas e padronizadas em nosso laboratório (Guimarães et al., 2013).

4. Resultados

Para uma melhor apresentação dos resultados, dividiu-se o trabalho em 2 capítulos, sendo o primeiro capítulo, os resultados obtidos com o fungo *A. japonicus* e o segundo capítulo, os resultados obtidos com o fungo *Aspergillus* sp. M1.

4.1. Capítulo 1

4.1.1. Produção de pectinases usando diferentes fontes de carbono

Para produção de pectinase por *A. japonicus* foram selecionadas algumas fontes de carbono indicadas como boas indutoras de produção na literatura e fontes de origem regional. A melhor fonte de carbono para a produção de pectinase foi a Erva Fina de Chimarrão Usada (2,10 U/ml) e a Erva de Tereré Média Fina Usada (1,90 U/ml) como mostrado na figura 1.

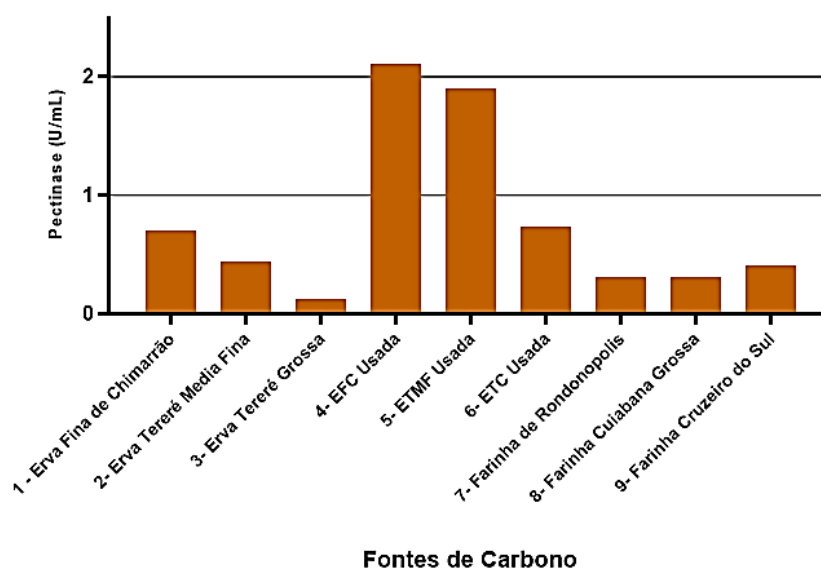


Fig 1. Produção de pectinase por *A. japonicus* em meio sólido usando diferentes fontes de carbono: 1-Erva Fina de Chimarrão; 2-Erva de Tereré Média Fina; 3-Erva de Tereré Grossa; 4-Erva Fina de Chimarrão usada; 5-Erva de Tereré Média Fina Usada; 6-

Erva de Tereré Grossa Usada; 7-Farinha de Rondonópolis; 8-Farinha Cuiabana Grossa; 9-Farinha do Cruzeiro do Sul.

4.1.2. Curva de crescimento para produção de pectinase

A curva do tempo de crescimento ótimo para a produção da enzima foi determinada usando erva de tereré média fina usada como fonte de carbono em meio sólido, com *A. japonicus* apresentando pico de produção após 48 horas (1,11 U/mg) decaindo em tempos maiores, como mostrado na figura 2.

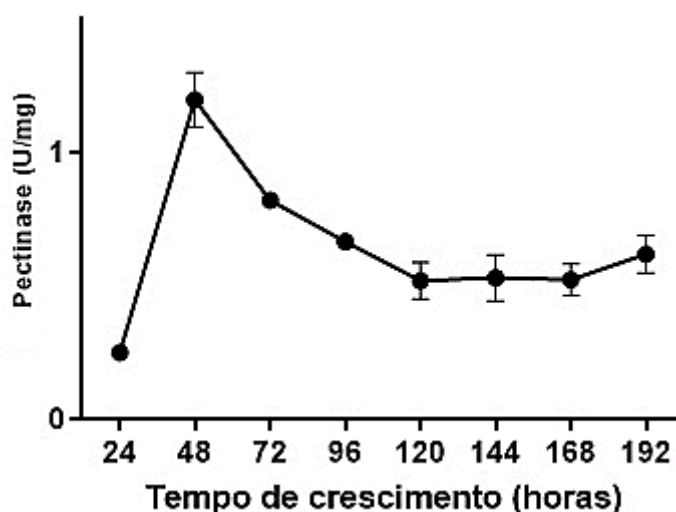


Fig 2. Curva de crescimento para produção da pectinase por *A. japonicus*. O fungo cresceu em meio sólido em erva de tereré média fina usada por um período de 24 a 192 horas à 35°C.

4.1.3. Influência do pH e temperatura na atividade da pectinase

Foram avaliadas também as condições ótimas para atividade da pectinase, como sua temperatura e pH ótimo. Pectinase produzida por *A. japonicus* teve atividade máxima à

60°C (2,16 U/ml) com declínio da atividade em temperaturas menores, diminuindo 54,91% da atividade em 50°C (0,977 U/ml), e também em temperaturas maiores, com atividade 64,88% mais baixa a 70°C (0,761 U/ml), (Fig. 3).

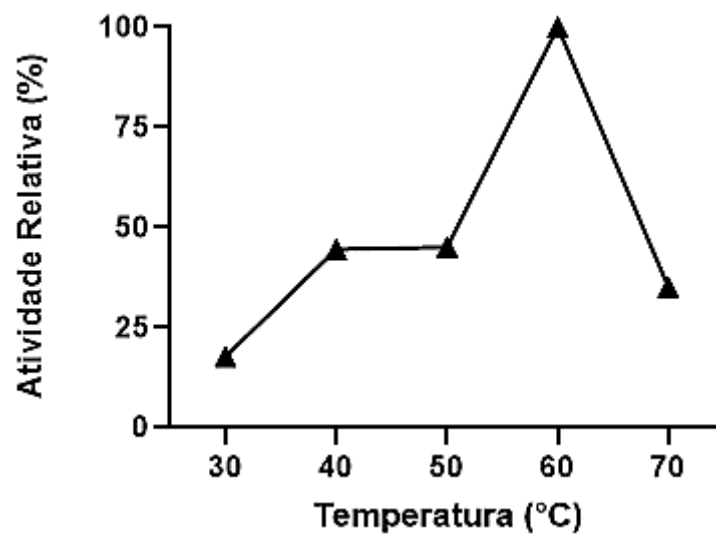


Fig 3. Influência da temperatura na atividade da pectinase de *A. japonicus*. A atividade enzimática foi determinada em temperaturas com variações entre 30 e 70 °C.

Quando avaliamos o pH da enzima de interesse, observamos que a pectinase apresentou atividade máxima em pH 3 (1,34 U/ml) mantendo sua atividade em 81,4% em pH 4 (1,09 U/ml) e mantendo-se em pH 5 (1,11 U/ml), conforme apresentado na figura 4.

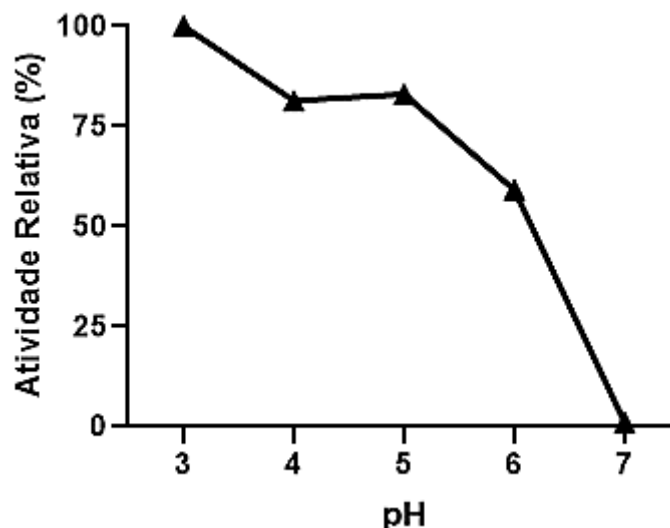


Fig 4. Influência do pH na atividade da pectinase de *A. japonicus*. A atividade foi determinada em diferentes pHs (3-7) utilizando tampão McIlvaine, nas condições ótimas já preestabelecidas a 60 °C.

4.1.4. Aplicação do extrato bruto de *A. japonicus* e pectinase comercial (Pectinex) na clarificação de sucos de frutas

O melhor resultado da clarificação usando o extrato bruto de *A. japonicus* foi alcançada com a polpa de suco de manga ‘Rosa’, com um aumento de $179 \pm 9,2\%$ na clarificação, enquanto a pectinase comercial obteve um aumento de $208,6 \pm 2,2$. Em seguida o suco de manga ‘Palmer’ obteve um aumento de $20,1 \pm 1,4\%$ na aplicação do extrato bruto e a pectinase comercial alcançou $11,6 \pm 2,9\%$ de clarificação. Já a polpa de manga ‘Haden’ apresentou clarificação de $12,9 \pm 2,5\%$ por *A. japonicus* e $3,7 \pm 2,1\%$ com a enzima comercial (Tabela 1).

Tabela 1. Clarificação de sucos de frutas com pectinases usando *A. japonicus* e Pectinex

Tipos de Manga	Clarificação Dos Sucos De Frutas (%)		pH
	50°C		
	<i>A. japonicus</i> - ETMF	Pectinex	
Espada	18,8 ± 1,4	58,9 ± 2,0	3,5-4,4
Haden	12,9 ± 2,5	3,7 ± 2,1	4,5-4,9
Palmer	20,1 ± 1,4	11,6 ± 2,9	3,6-4,5
Rosa	179,0 ± 9,2	208,6 ± 2,2	3,4-3,7
Tommy	18,9 ± 1,7	99,2 ± 3,1	3,2-4,5

4.2. Capítulo 2

4.2.1. Produção de pectinases usando diferentes fontes de carbono por *Aspergillus* sp. M1

Para verificar qual a melhor fonte de carbono induziria a produção de pectinase pelo *Aspergillus* sp. M1, testamos alguns resíduos industriais, além de resíduos encontrados na região de Mato Grosso do Sul as quais são fontes de carbono regionais, conforme apresentado na figura 5. O meio sólido foi o melhor indutor de produção de pectinase, com a Casca de Maracujá (3,85 U/ml), seguida de Erva Fina de Chimarrão Usada (2,89 U/ml), Farelo de Arroz (2,71 U/ml) e a Erva de Tereré Média Fina Usada (2,19 U/ml) como fontes de carbono.

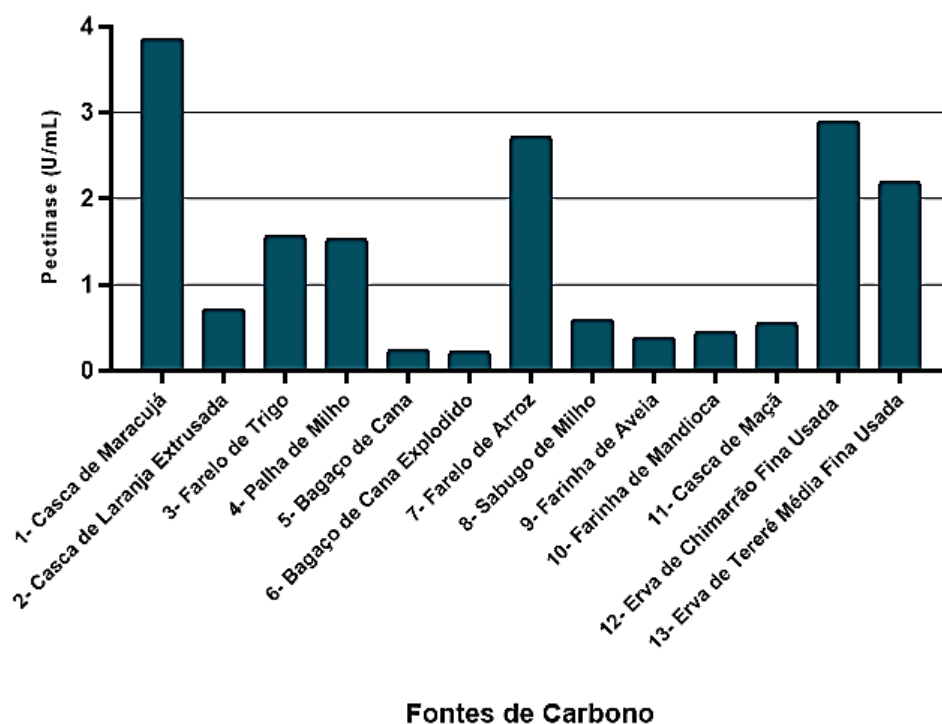


Fig 5. Produção de pectinase usando diferentes fontes de carbono por *Aspergillus* sp. M1 em meio sólido durante 120 horas a 35°C. Fonte de carbono usada: 1- Casca de Maracujá; 2- Casca de Laranja Extrusada; 3- Farelo de Trigo; 4- Palha de Milho; 5- Bagaço de Cana; 6- Bagaço de Cana Explodido; 7- Farelo de Arroz; 8- Sabugo de Milho; 9- Farinha de Aveia; 10- Farinha de Mandioca; 11- Casca de Maçã; 12- Erva Fina de Chimarrão Usada; 13- Erva de Tereré Média Fina Usada

4.2.2. Curva de crescimento para produção de pectinase por *Aspergillus* sp. M1

A curva do tempo de crescimento ótimo para a produção da enzima foi determinada usando erva de tereré média fina usada e casca de maracujá como fonte de carbono em meio sólido, com *Aspergillus* sp. M1 em erva de tereré atingindo pico de produção após 72 horas (1,83 U/mg), com declínio de produção após este período, com atividade específica caindo 32,78% em 96 horas e 70% após 120 horas. Já com a casca de maracujá, a atividade máxima foi atingida após 48 horas (3,35 U/mg), decaindo 68,34% após este período (Fig. 6).

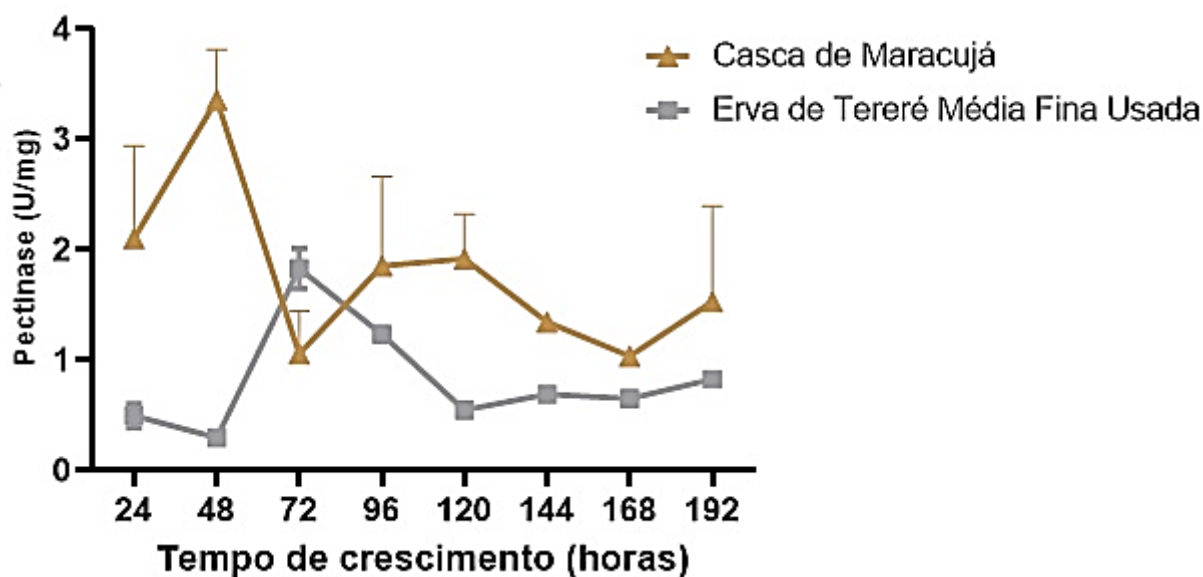


Fig 6. Curva de crescimento para produção da pectinase por *Aspergillus* sp. M1. Ambos os fungos cresceram em meio sólido por um período de 24 a 192 horas à 35°C.

4.2.3. Influência do pH e temperatura na atividade da pectinase de *Aspergillus* sp. M1

A influência da temperatura e pH foram avaliadas a fim de determinar as condições ótimas para atividade e consequente aplicação da enzima. A pectinase produzida por *Aspergillus* sp. M1 na presença de erva de tereré média fina usada teve atividade máxima à 70°C (4,32 U/ml) com declínio da atividade em temperaturas menores, perdendo 6,22% da atividade a 60°C (4,053 U/ml) e 19,71% a 50°C (3,47 U/ml). Enquanto a enzima produzida pelo mesmo fungo, mas em casca de maracujá como fonte de carbono teve atividade máxima à 60°C (5,40 U/ml), com redução da atividade em temperaturas inferiores, chegando a apenas 77,5% da atividade máxima a 50°C, e superiores, com atividade caindo em 44,7% a 70°C (2,989 U/ml) (Fig.7).

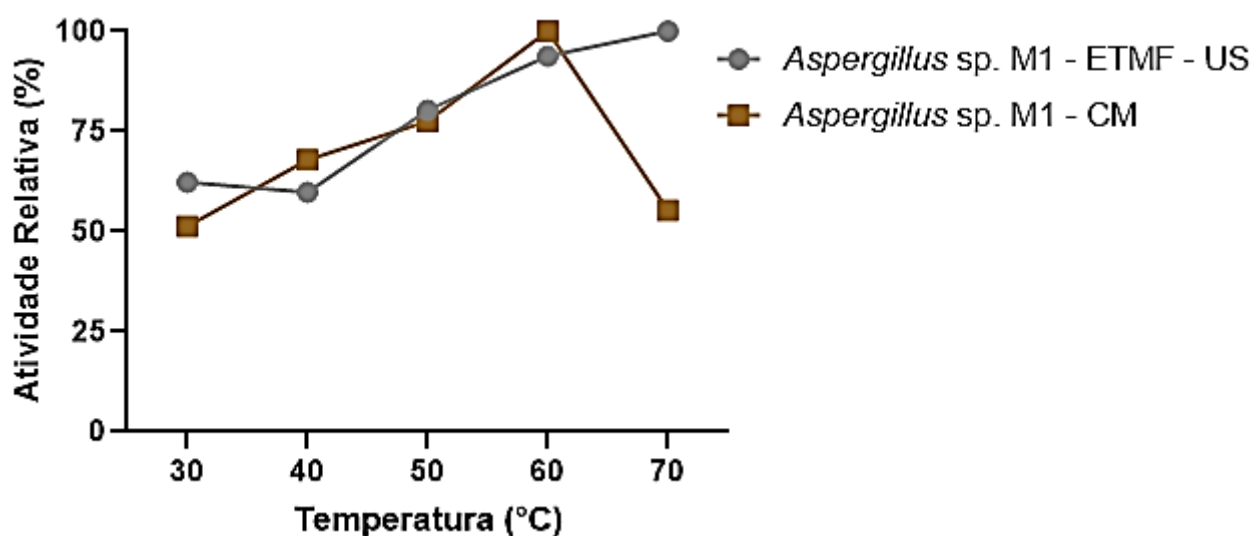


Fig 7. Influência da temperatura na atividade da pectinase de *Aspergillus* sp. M1. A atividade enzimática foi determinada em temperaturas com variações entre 30 e 70 °C.

A enzima produzida por *Aspergillus* sp. M1 em erva de tereré usada apresentou pico de atividade em pH 3 (2,58 U/ml), mas manteve 98,2% da atividade em pH 4 (2,53 U/ml), da mesma forma, pectinase produzida na presença de casca de maracujá teve pico de atividade em pH 4 (3,799 U/ml), mas mantendo 90,62% da atividade em pH 3 (3,44 U/ml) e 81,15% da atividade em pH 5 (3,08 U/ml), (Fig. 8).

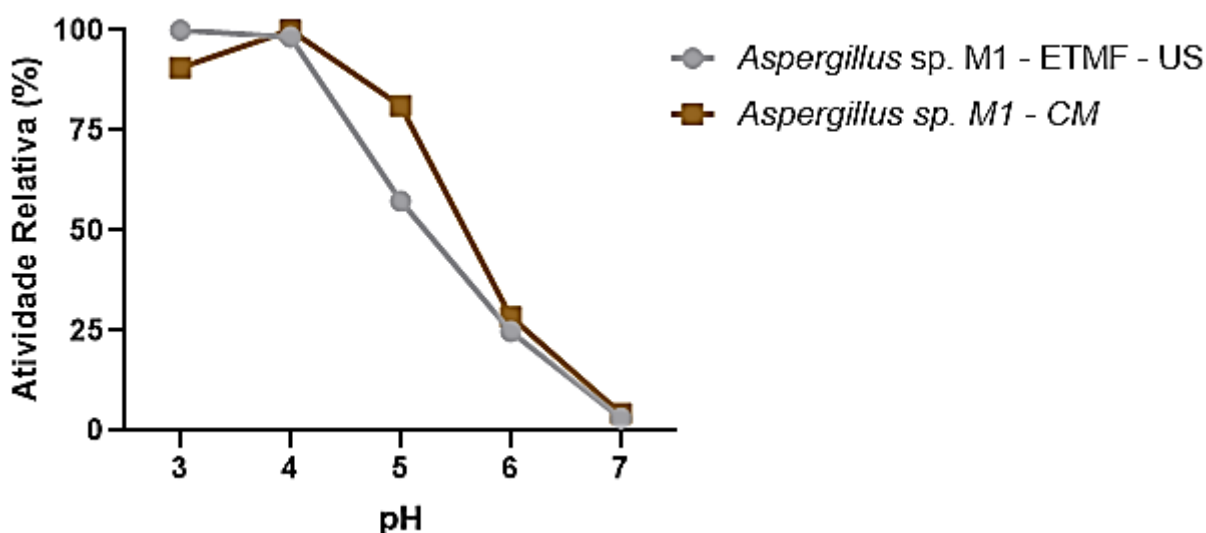


Fig 8. Influência do pH na atividade da pectinase de *Aspergillus* sp. M1. A atividade foi determinada em diferentes pHs (3-7) utilizando tampão McIlvaine, nas condições ótimas já preestabelecidas a 60 °C.

4.2.4. Aplicação do extrato bruto de *Aspergillus* sp. M1 e pectinase comercial (Pectinex) para clarificação de sucos de frutas

Para a aplicação do extrato bruto de *Aspergillus* sp. M1 para a clarificação, foi usado apenas o extrato produzido com erva de tereré como fonte de carbono, tendo em vista a coloração escura do extrato produzido com casca de maracujá, podendo interferir na transmitância das polpas. A melhor clarificação usando o extrato de *Aspergillus* sp. M1 foi alcançada com a polpa de suco de manga ‘Rosa’, com um aumento de $178,9 \pm 9,9\%$ na clarificação do suco e $208,6 \pm 2,2\%$ com pectinase comercial. Já o suco de manga ‘Palmer’ obteve um aumento de $22,1 \pm 2,9\%$ na clarificação, enquanto a pectinase comercial teve $11,6 \pm 2,9$ de clarificação. Em seguida, a polpa de manga ‘Haden’ apresentou clarificação de $7,4 \pm 3,2\%$ com pectinase produzida pelo fungo e $3,7 \pm 2,1\%$ com a enzima comercial (Tabela 2).

Tabela 2. Clarificação de sucos de frutas usando pectinases de *Aspergillus* sp. M1 e Pectinex

Tipos de Mangas	Clarificação Dos Sucos De Frutas (%)		pH
	50°C		
	<i>Aspergillus</i> sp. M1 - ETMF	Pectinex	
Espada	32,3 ± 1,1	58,9 ± 2,0	3,5-4,4
Haden	7,4 ± 3,2	3,7 ± 2,1	4,5-4,9
Palmer	22,1 ± 2,9	11,6 ± 2,9	3,6-4,5
Rosa	178,9 ± 9,9	208,6 ± 2,2	3,4-3,7
Tommy	40,3 ± 3,2	99,2 ± 3,1	3,2-4,5

5. Discussão

Dentre as diversas fontes de carbono testada, *Aspergillus* sp. M1 apresentou melhores resultados com Casca de Maracujá, Farelo de Arroz, Erva Fina de Chimarrão Usada e a Erva de Tereré Média Fina Usada, enquanto *A. japonicus* também obteve produção de pectinase mais expressiva em meio sólido com as Erva Fina de Chimarrão Usada e Erva de Tereré Média Fina Usada.

Resultados semelhantes a *Aspergillus* sp. M1 foram encontrados na literatura na produção de pectinase com farelo de arroz em meio sólido por *Aspergillus niger* (Fawole and Odunfa, 2003) e *Aspergillus fumigatus* R6 (Wong et al., 2017). *A. niger* também foi citada como boa produtora na presença de Casca de Maracujá em meio sólido por Marlia *et al.* (2014), assim como *A. oryzae* (Jaramillo et al., 2015), *A. niveus* (Maller et al., 2012) e *A. aculeatus* URM4953 (Silva et al., 2018).

Já ambos os fungos apresentaram produção significativa nas ervas de chimarrão e tereré. A erva de tereré é uma fonte de flavonoides, vitaminas A, B, C e E e polifenóis, que podem ser aplicados em vinhos, sucos e óleos vegetais, aumentando o valor nutricional destes produtos, mostrando que mais estudos são necessários devido ao seu potencial bioquímico (Heemann et al., 2019). Como ambas são fontes regionais geradoras de grandes quantidades de resíduos, e ainda existem poucos estudos relacionando-as como fonte de carbono para produção enzimática, estabelecendo um resultado interessante nesse estudo. Logo, as fontes escolhidas para a continuidade da caracterização foram a casca de maracujá, por apresentar melhor produtividade, e a erva de tereré usada, por ser uma fonte regional ainda pouco estudada.

Um estudo do tempo de crescimento usando *A. japonicus* em erva de tereré e *Aspergillus* sp. M1 em casca de maracujá mostraram um pico de produção da pectinase após 48 horas

de crescimento, enquanto *Aspergillus* sp. M1 em erva de tereré apresentou pico de produção em 72 horas de crescimento. Da mesma forma, outras cepas de *A. japonicus* também foram reportadas obtendo 48 horas como melhor tempo para produção desta enzima (Teixeira et al., 2000), assim como *Penicillium griseoroseum* apresentou produção máxima com 48 horas (Piccoli-Valle et al., 2001) e *Aspergillus aculeatinus* com pico de produção em 46 horas (Garzon et al., 2021). Por outro lado, outras espécies deste gênero também já apresentaram produção máxima de pectinase durante 72 horas de crescimento, como *Aspergillus niger* (Rocha et al., 2020; Sandri & Silveira, 2018) e *Aspergillus japonicus* (Li et al., 2015; Teixeira et al., 2021).

A temperatura teve efeito semelhante na pectinase produzida por *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 crescido em casca de maracujá, ambos com atividade máxima a 60°C, enquanto *Aspergillus* sp. M1 atingiu 93,7% de sua atividade máxima nesta temperatura, tendo seu pico de atividade a 70°C. Efeito semelhante a pectinase produzidas por *Thermoascus aurantiacus* (Martins et al., 2002) e *Aspergillus aculeatus* (Silva et al., 2019) que também apresentaram atividade máxima à 60°C. Enquanto o extrato bruto de *Candida orthopsilosis*, obteve atividade máxima entre 40 e 70°C (Aggarwal et al., 2020), além de pectinases produzidas por bactérias também tem relatos de temperaturas ótimas variando entre 40 e 65°C (Velusamy et al., 2015), chegando até 70°C com *Bacillus pumillus* (Klug-Santner et al., 2006). Estes resultados se mostram relevantes já que diversos processos industriais ocorrem em altas temperaturas, sendo necessário o resfriamento antes da aplicação enzimática, logo o uso de enzimas tolerantes a temperaturas maiores pode eliminar esta etapa, diminuindo o custo de produção (Brienzo et al., 2009).

O efeito do pH na pectinase produzida por ambos os fungos foram semelhantes, com atividade máxima em pH 3, mantendo-se estável em pH 4 e 5 e declínio acima disto.

Diversos resultados semelhantes foram encontrados na literatura, pectinase produzida por *A. japonicus* apresentando atividade máxima em pH variando entre 4 e 5,5 (Semenova et al., 2003), assim como a enzima expressa por *Pichia pastoris*, com máxima atividade entre pH 4 e 5 (Habrylo et al., 2018). Outras espécies do gênero *Aspergillus* também apresentaram pH 4 para ótima atividade da pectinase, como *Aspergillus niger* (Anand et al., 2017) e *A. awamori* (Adedeji & Ezekiel, 2019), além de *A. niger* SW06 e *Penicillium janthinellum* VI2R3M apresentando atividade máxima em pH 5. Dado que o pH de sucos comerciais varia entre 3 e 5,5 (Berger, 2014) e o pH dos sucos de manga testados variou entre 3,2 e 4,9, os resultados obtidos indicam que o extrato de *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 pode vir a ter bons resultados no processo de clarificação de sucos.

Dentre as diversas polpas de mangas na qual os extratos com pectinase foram aplicados, os melhores resultados para clarificação foram com as polpas de manga ‘Haden’ e ‘Palmer’ tanto para pectinase produzida por *A. japonicus* quanto por *Aspergillus* sp. M1. Da mesma forma, pectinase produzida por *A. foetidus* foi reportada com clarificação de 92% em sucos de manga (Kumar et al., 2012), enquanto pectinase produzida por *Penicillium oxalicum* CZ1028 produziu um aumento de 5% na transmitância de sucos da mesma fruta (Cheng et al., 2017). Pectinases também mostraram aumento na clarificação em sucos de outras frutas, como na polpa de mamão, aumentando a clarificação em 29,5% com enzimas produzidas por *Penicillium oxalicum* (Cheng et al., 2016) e 71,8% de clarificação na aplicação de pectinase em suco de maçã (Yuan et al., 2011).

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo, mostrou que há produção de pectinase na presença de erva de tereré usada para *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1. As temperaturas ótimas foram de 60°C para *A. japonicus* e 70° para *Aspergillus* sp. M1, enquanto o pH ótimo foi de 3 para ambos os fungos. A pectinase de *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M1 clarificaram o suco de manga, especialmente das variedades ‘Haden’ e ‘Palmer’, semelhante à enzima pectinase comercial. Mostrando potencial para aplicação em indústrias de bebidas, promovendo uma produção mais eficiente e econômica de suco de manga.

7. Referencias

- Adedeji, O. E., & Ezekiel, O. O. (2019). Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: Purification and application in mango juice extraction. *Bioresource Technology Reports*, 7(August), 100306. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100306>
- Aggarwal, R., Dutta, T., & Sheikh, J. (2020). Extraction of pectinase from *Candida* isolated from textile mill effluent and its application in bio-scouring of cotton. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100291. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100291>
- Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2017). Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, 7(2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0760-3>
- Berger, M. (2014). Pectinases e pectina : aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Caderno Pedagógico*, 1, 130–139.
- Bharathiraja, S., Suriya, J., Krishnan, M., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2017). Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 80, pp. 125–148). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.003>
- Brienzo, M., Arantes, V., & Milagres, A. M. F. (2009). Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal Biology Reviews*, 22(3–4), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.04.001>
- Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., Luo, Z., & Huang, R. (2016). A Novel acid-stable endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: Purification, characterization, and application in the beverage industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 989–998. <https://doi.org/10.4014/jmb.1511.11045>
- Cheng, Z., Chen, D., Wang, Q., Xian, L., Lu, B., Wei, Y., Tang, H., Lu, Z., Zhu, Q., Chen, Y., & Huang, R. (2017). Identification of an acidic endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(6), 665–672. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2017.01.013>
- Garzon, C. D., Habrylo, O., Lemaire, A., Guillaume, A., Carré, Y., Millet, C., Fourtot-Brun, C., Trezel, P., Le Blond, P., Perrin, A., Georgé, S., Wagner, M., Coutel, Y., Levavasseur, L., Pau-Roblot, C., & Pelloux, J. (2021). Characterization of a novel strain of *Aspergillus aculeatinus*: From rhamnogalacturonan type I pectin degradation to improvement of fruit juice filtration. *Carbohydrate Polymers*, 262(February). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117943>
- Habrylo, O., Evangelista, D. E., Castilho, P. V., Pelloux, J., & Henrique-Silva, F. (2018). The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications.

- International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 499–508.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.172>
- Heemann, A. C. W., Heemann, R., Kalegari, P., Spier, M. R., & Santin, E. (2019). Enzyme-assisted extraction of polyphenols from green yerba mate. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.22217>
- Jarvis, M. C., Forsyth, W., & Duncan, H. J. (1988). A Survey of the Pectic Content of Nonlignified Monocot Cell Walls. *Plant Physiology*, 88(2), 309–314.
<https://doi.org/10.1104/pp.88.2.309>
- John, J., Kaimal, K. K. S., Smith, M. L., Rahman, P. K. S. M., & Chellam, P. V. (2020). Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1086–1099.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>
- Joshi, V. K., Parmar, M., & Rana, N. (2011). Purification and characterization of pectinase produced from Apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. In *Indian Journal of Natural Products and Resources* (Vol. 2, Issue 2).
- Kant, S., Vohra, A., & Gupta, R. (2013). Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, 87(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.014>
- Klug-Santner, B. G., Schnitzhofer, W., Vršanská, M., Weber, J., Agrawal, P. B., Nierstrasz, V. A., & Guebitz, G. M. (2006). Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *Journal of Biotechnology*, 121(3), 390–401. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2005.07.019>
- Kumar, Y. S., Kumar, P. V., & Reddy, O. V. S. (2012). Pectinase Production from Mango Peel Using *Aspergillus foetidus* and its Application in Processing of Mango Juice. *Food Biotechnology*, 26(2), 107–123.
<https://doi.org/10.1080/08905436.2012.670830>
- Li, P. jun, Xia, J. lan, Shan, Y., & Nie, Z. yuan. (2015). Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(10), 2013–2022.
<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1442-3>
- Maktouf, S., Neifar, M., Drira, S. J., Baklouti, S., Fendri, M., & Châabouni, S. E. (2014). Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. *Food and Bioprocess Processing*, 92(1), 14–19.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.07.003>
- Martins, E. S., Silva, D., Da Silva, R., & Gomes, E. (2002). Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, 37(9), 949–954. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00300-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00300-4)

- Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. *Processing and Sustainability of Beverages* (pp. 235–273). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2>
- Panesar, P. S., Kaur, R., Singla, G., & Sangwan, R. S. (2016). Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: Progress and prospects. *Applied Food Biotechnology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 208–227). National Nutrition and Food Technology Research Institute. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i4.13458>
- Piccoli-Valle, R. H., Maria Lopes Passos, F., José Vieira Passos, F., & Olzany Silva, D. (2001). PRODUCTION OF PECTIN LYASE BY *PENICILLIUM GRISEOROSEUM* IN BIOREACTORS IN THE ABSENCE OF INDUCER. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 135–140.
- Rocha, J. da C., da Silva Araújo, J., de Paiva, W. K. V., Ribeiro, E. S. S., de Araújo Padilha, C. E., de Assis, C. F., dos Santos, E. S., de Macêdo, G. R., & de Sousa Junior, F. C. (2020). Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30(November). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101876>
- Sandri, I. G., Lorenzoni, C. M. T., Fontana, R. C., & da Silveira, M. M. (2013). 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*, 51(2), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.015>
- Sandri, I., & Silveira, M. (2018). Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. *Beverages*, 4(3), 48. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Semenova, M. V., Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., & Sinitsyn, A. P. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)*, 68(5), 559–569. <https://doi.org/10.1023/A:1023959727067>
- Silva, J. de C., de França, P. R. L., de Melo, A. H. F., Neves-Petersen, M. T., Converti, A., & Souza Porto, T. (2018). Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, 79, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.014>
- Silva, J. de C., de França, P. R. L., de Melo, A. H. F., Neves-Petersen, M. T., Converti, A., & Souza Porto, T. (2019). Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, 79, 18–27. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.12.014>
- Teixeira, M. F. S., Lima Filho, J. L., & Durán, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 286–290. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400009>

- Teixeira, W. F. A., Batista, R. D., do Amaral Santos, C. C. A., Júnior, A. C. F., Terrasan, C. R. F., de Santana, M. W. P. R., de Siqueira, F. G., de Paula-Elias, F. C., & de Almeida, A. F. (2021). Minimal Enzymes Cocktail Development by Filamentous Fungi Consortia in Solid-State Cultivation and Valorization of Pineapple Crown Waste by Enzymatic Saccharification. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2521–2539. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01199-8>
- Velusamy, P., Pachaiappan, R., Christopher, M., Vaseeharan, B., Anbu, P., & So, J.-S. (2015). Isolation and identification of a novel fibrinolytic *Bacillus tequilensis* CWD-67 from dumping soils enriched with poultry wastes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 61(6), 241–247. <https://doi.org/10.2323/JGAM.61.241>
- Wang, B., Dong, F., Chen, M., Zhu, J., Tan, J., Fu, X., Wang, Y., & Chen, S. (2016). Advances in Recycling and Utilization of Agricultural Wastes in China: Based on Environmental Risk, Crucial Pathways, Influencing Factors, Policy Mechanism. *Procedia Environmental Sciences*, 31, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.02.002>
- Wong, L. Y., Saad, W. Z., Mohamad, R., & Tahir, P. M. (2017). Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Industrial Crops and Products*, 97, 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.12.019>
- Yuan, P., Meng, K., Huang, H., Shi, P., Luo, H., Yang, P., & Yao, B. (2011). A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification. *Food Chemistry*, 129(4), 1369–1375. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.05.065>