



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Aplicação de extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus oryzae* no tratamento de suco de maçã

Lenara Meneghel, Marielem Santos, Aline Pozza, Caroline Rossi, Betina Miglioranza, Eloane Malvessi e Mauricio Moura da Silveira

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia  
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: lmscatharina@ucs.br

#### RESUMO

*As enzimas pectinolíticas são capazes de degradar substâncias pécicas que conferem alta viscosidade e turbidez a sucos de frutas e vinhos, facilitando as etapas de filtração e concentração, aumentando o rendimento global do processo e evitando processos químico-físicos que poderiam alterar as características do produto final. A atividade catalítica destas enzimas é influenciada por fatores como pH e temperatura. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso, com respeito às faixas ideais de temperatura e pH, avaliar a termoestabilidade e a aplicabilidade no tratamento de clarificação e redução de turbidez de suco de maçã. As melhores condições de utilização das enzimas avaliadas foram a 50°C, em pH 4,0. Nestas condições, o tratamento enzimático de suco de maçã apresentou resultados comparáveis aos obtidos com uma preparação comercial de alta qualidade.*

Palavras-chave: pectinase, caracterização, clarificação de suco.

#### INTRODUÇÃO

As enzimas, catalisadores altamente específicos para seus substratos, são úteis em diversos setores industriais já que, quando comparadas aos catalisadores químicos, contribuem para processos capazes de gerar produtos de qualidade. Por exemplo, as enzimas pectinolíticas são capazes de degradar substâncias pécicas que conferem alta viscosidade e turbidez a sucos de frutas e vinhos, facilitando as etapas de filtração e concentração, aumentando o rendimento global do processo, evitando processos físico-químicos que poderiam alterar as características do produto final.

A atividade catalítica das enzimas é influenciada por fatores como concentração enzimática, concentração do substrato, pH e temperatura. Uma característica que favorece a aplicação de pectinases fúngicas na indústria de alimentos é o fato de o pH ideal de ação de suas enzimas se aproximar do valor de pH de muitos sucos de frutas, ou seja, na faixa de 3,0 a 5,5 (Ueda *et al.*, 1982). Com relação à temperatura, Jayani *et al.* (2005) identificaram que a faixa ótima de ação das pectinases varia de 30 e 50°C. Mohsen *et al.* (2009) determinaram que poligalacturanases são relativamente termoinstáveis e que a perda de atividade é proporcional ao aumento da temperatura.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar um extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso, com respeito às faixas ideais de temperatura e pH, avaliar a sua termoestabilidade e a aplicabilidade no tratamento de clarificação e redução de turbidez de suco de maçã.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### MATERIAL E MÉTODOS

O extrato pectinolítico foi obtido em cultivo submerso de *A. oryzae* IPT-301, conforme descrito por Meneghel *et al.* (2014).

A atividade de pectinases totais foi determinada pela medida da redução de viscosidade de uma solução 0,63% (m/v) de pectina em viscosímetro Brookfield modelo LVDV-II, em pH 4,0, a 30°C, após 30 minutos, pelo método descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi (2000). Uma unidade de pectinase foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução e expressa em U/mL.

As condições de pH em que ocorre a atividade máxima foram determinadas a 30°C e as temperaturas foram avaliadas em pH 4,0. Os valores de pH testados variaram de 2,5 a 8,0, fixados com tampão fosfato-citrato, e os de temperatura de 20 a 60°C. A termoestabilidade do extrato pectinolítico foi avaliada na faixa de 20 a 60°C, em tempos de pré-incubação de 0 a 150 minutos, em pH 4,0.

O tratamento enzimático do suco de maçã Gala (*Malus domestica*) com a preparação experimental foi realizado em comparação com o uso do produto comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes Latin America Ltda). O suco de maçã foi obtido com auxílio de um processador de alimentos. A dosagem utilizada foi de 1,0 unidade enzimática por mL de suco, mantendo-se a mistura a 50°C por 60 minutos. A reação enzimática foi interrompida em banho de gelo. A clarificação foi determinada por intensidade de cor, medida em espectrofotômetro, seguindo a metodologia proposta por Sandri *et al.* (2011). A turbidez dos sucos foi determinada em turbidímetro (Digimed Modelo Dm TU), à temperatura ambiente.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 são mostrados os valores de atividade de pectinases determinados em diferentes condições de pH (a) e temperatura (b).

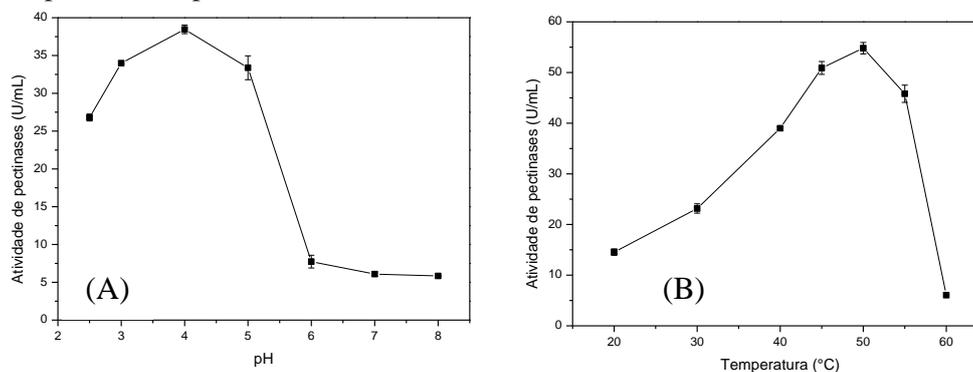


Figura 1 - Atividade de pectinases totais em função do pH (a) e da temperatura (b).

Observou-se aumento gradativo de atividade a partir de pH 2,5, com o máximo em pH 4,0. Nos testes com valores de pH superiores a 5,0, houve queda acentuada da atividade enzimática, sendo que apenas 20% foi mantida, o que está de acordo com resultados obtidos por Malvessi e Silveira (2004), Fontana *et al.* (2009) e Sandri *et al.* (2013).

Entre as temperaturas testadas, houve aumento da atividade com o incremento até 50°C, sendo que para maiores temperaturas a ação da enzima foi drasticamente afetada, com redução de cerca de 90%, a 60°C, o que pode ser indicativo de desnaturação da enzima.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Kashyap *et al.* (2001) e Al-Najada (2014) descreveram que pectinases produzidas possuem atividade máxima em torno de 50°C.

Além disso, os resultados obtidos para o pico de atividade pectinolítica do extrato de *A. oryzae* foram semelhantes às características de preparações comerciais, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – pH e temperatura das máximas atividades de pectinases obtidas para o extrato de *A. oryzae* e faixas de aplicação de preparações enzimáticas comerciais constantes dos catálogos das formulações.

	Extrato de <i>A. oryzae</i>	Pectinex® Ultra*
pH	4,0	3,0 a 4,2
Temperatura (°C)	50	10 a 60

\* Dados disponíveis em: <http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Pectinex%20Ultra%20AFP%20App%20Sheet.pdf>.

Na Figura 2, são mostrados os resultados de termoestabilidade do extrato pectinolítico de *A. oryzae*. Constatou-se que a atividade manteve-se estável até 150 minutos de incubação a 30 e 40°C, de forma semelhante à descrita por Sandri *et al.* (2011) para extratos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, obtido em cultivo sólido, e *Aspergillus fumigatus*, produzido em cultivo submerso. Já Poletto *et al.* (2014) verificaram que o extrato pectinolítico produzido por *A. niger* em meio sólido mostrou-se estável apenas nas temperaturas de 20 e 30°C.

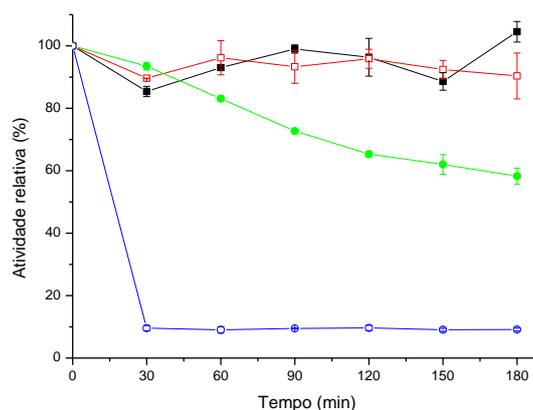


Figura 2 - Estabilidade térmica expressa em atividade, em função do tempo de incubação: (■) 30°C; (□) 40°C; (●) 50°C; (○) 60°C.

No tratamento enzimático do suco de maçã, optou-se por utilizar a temperatura de 50°C, por ter sido a que proporcionou maiores atividades no extrato em estudo (Figura 1 B), mantendo cerca de 80% desta atividade após 60 minutos de incubação. Além disso, Bon *et al.* (2008) relatam que temperaturas entre 50 e 60°C são utilizadas na etapa de maceração da uva para produção de vinho. O pH do suco de maçã, em torno de 4,0, se mostrou adequado, visto ter sido esta a melhor condição de pH para a ação do complexo enzimático (Figura 1 A). Como controle, utilizou-se a preparação comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes Latin America Ltda). Os resultados obtidos após 60 minutos de tratamento enzimático estão mostrados na Tabela 2.

O tratamento enzimático com o extrato produzido experimentalmente apresentou resultados comparáveis aos obtidos com a preparação pectinolítica comercial. Sandri *et al.* (2013) e Poletto (2015), utilizando extrato enzimático produzido por *A. niger* LB-02-SF em



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

cultivo sólido, também obtiveram percentuais de aumento de clarificação, redução de turbidez e viscosidade, semelhantes em comparação com enzimas comerciais.

Tabela 2 - Efeito do tratamento enzimático no aumento da clarificação, na redução da turbidez e da viscosidade de suco de maçã.

	Aumento da clarificação (%)	Redução da turbidez (%)	Redução da viscosidade (%)
<b>Extrato deste estudo</b>	79,1	97,7	10,8
<b>PectinexUltra SP-L</b>	81,7	98,5	13,2

### CONCLUSÕES

Os resultados indicam o potencial de utilização comercial do extrato enzimático obtido em cultivo submerso de *A. oryzae* IPT-301, uma vez que apresenta resultados semelhantes aos de preparações comerciais de alta qualidade no tratamento de suco de maçã.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul, à FAPERGS, ao CNPq e à CAPES pelo apoio estrutural, financeiro e pela concessão de bolsas de estudo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Najada AR. 2014. Partial purification and physicochemical characterization of polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. Life Scienc. J. 11(5): 253-259.
- Bon EPS, Costa RB, Silva M, Ferreira-Leitão, VS, Freitas SP, Ferrara MA. 2008. Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência.
- Fontana RC, Polidoro TA, Silveira MM. 2009. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Bioresour. Technol 100: 4493-4498.
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochem. 40: 2931-2944.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresour. Technol 77: 215-227.
- Maiorano AE. 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
- Malvessi E. 2000. Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul.
- Malvessi E, SILVEIRA MM. 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Braz. Arch. Biol Techn. 47: 693-702.
- Meneghel L, Reis GP, Reginatto C, Malvessi E, Silveira MM. 2014. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. Process Biochem 49: 1800-1807.
- Mohsen SM, Bazaraa WA, Doukani K. 2009. Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: 4<sup>o</sup> Conference on Recent Technologies in Agriculture. Anais: 805 – 817. Egito.
- Poletto P, Borsoi C, Reginatto C, Zeni M, Silveira MM. 2014. Aplicação de preparação pectinolítica fúngica obtida por cultivo em estado sólido na extração de suco de uva. In: XX COBEQ. Anais.
- Sandri IG, Fontana RC, Barfknecht DM, Silveira MM. 2011. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. LWT - Food Sci. Technol 44: 2217-2222.
- Sandri IG, Lorenzoni CMT, Fontana RC, Silveira MM. 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice, LWT – Food Sci. Technol 51: 459-475.
- Ueda S, Fujio Y, Lim JY. 1982. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A. 3. J. Appl. Biochem 4: 524-532.