

CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) UTILIZANDO PECTINASES DE *Aspergillus aculeatus* URM4953

Clarification of Cajá juice (Spondias mombin l.) using pectinases from Aspergillus aculeatus URM4953

Resumo:

No processo de clarificação de sucos de frutas, usar pectinases é importante para promover a redução da viscosidade. Esta redução proporciona a minimização de custos nos processos industriais. Assim, este trabalho objetivou clarificar o suco de Cajá (*Spondias mombin* L.) utilizando as pectinases de *Aspergillus aculeatus* URM4953 com auxílio de planejamento fatorial 22. O extrato enzimático apresentou atividades de 2,61 U/mL (poligalacturonase), 2,59 U/mL (endo-poligalacturonase), 7,02 U/mL (pectina liase) e 43,5 U/mL (pectina esterase). No processo de clarificação, as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 reduziram a viscosidade do suco de cajá (89,1%) nas condições de 50°C durante 50 minutos. A análise estatística revelou que com exceção da viscosidade, as demais características físico-químicas não apresentaram efeitos significativos. Assim as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 apresentaram grande potencial para aplicações em processos industriais de clarificação de sucos.

Abstract:

In the clarification process of fruit juices, to use pectinase is important to promote the reduction of the viscosity. This reduction provides the minimization of the industrial process costs. Then, this work aimed to clarify the Cajá juice (*Spondias mombin* L.) using the pectinases from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by 22 factorial design. The enzymatic extract showed activities of 2.61 U/mL (polygalacturonase), 2.59 U/mL (endo polygalacturonase), 7.02 U/mL (pectin lyase) and 43.5 U/mL (pectin esterase). In the clarification process of cajá juice, the pectinases produced by *A. aculeatus* URM4953 reduced the juice viscosity (89.1%) under the conditions 50°C for 50 minutes. The statistical analysis revealed that except to viscosity reduction, the others physical-chemical characteristics did not display significant effects. Then, the pectinases produced by *A. aculeatus* URM4953 presented great potential to application in industrial process of juice clarification.



**Pedro Renann Lopes de França¹,
Jônatas de Carvalho Silva,
Tatiana Souza Porto**

¹Graduando em engenharia de alimentos, UFRPE, Garanhuns. E-mail: pr-lf@hotmail.com

Contato principal

Pedro Renann Lopes de França¹



Palavras chave: Pectinases, Clarificação, *Aspergillus aculeatus* URM4953.

Keywords: Pectinases, Clarification, *Aspergillus aculeatus* URM4953



INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas são carboidratos presentes na lamela média e nas paredes celulares primárias dos tecidos vegetais que conferem a estrutura rígida dos vegetais (MARTOS et al., 2014). Esses carboidratos presentes nos sucos de frutas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência destes, bem como por a alta viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração. Assim a adição de enzimas pectinolíticas causa a degradação de tais substâncias, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (UENOJO; GLAUCIA; PASTORE, 2007).

O complexo enzimático que possui o potencial de degradação das substâncias pécticas, são denominadas pectinases. Estas compreendem as enzimas de maior importância para a indústria de sucos, compondo assim 25% das vendas globais de enzimas para fins alimentares (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; DEY et al., 2014).

Existem basicamente três tipos de pectinases, as desesterificantes, despolimerizantes (pectina liase, endopoligalacturonase e poligalacturonase) e protopectinases (a qual não apresenta interesse comercial), estas são classificadas de acordo com o mecanismo de ação e substrato específico (UENOJO; GLAUCIA; PASTORE, 2007). A pectina esterase (PE) catalisa a retirada do grupo metil dos ácidos galacturônicos, carboidrato constituinte da pectina, e libera pectina desesterificada e metanol. A pectina liase (PL) despolimeriza a pectina por β -eliminação, resultando na formação de ácido galacturônico com uma insaturação entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (REHMAN; QADER; AMAN, 2012). A endopoligalacturonase (endoPG) promove a hidrólise randômica da cadeia polimérica (CORDEIRO; MARTINS, 2009). Dentre as pectinases a poligalacturonase (PG) apresenta maior interesse comercial, uma vez que esta é a principal enzima despolimerizante com a maior função hidrolítica na cadeia polimérica (SOUZA et al., 2010), sendo capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 da pectina (REHMAN; QADER; AMAN, 2012).

O Cajá (*Spondias mombin* L.) é uma fruta bastante popular no Brasil, consumida na forma in natura principalmente no Nordeste, e mais comumente na forma de polpa em outras regiões do país. Embora exista alta expectativa de expansão do seu cultivo o fruto é altamente perecível, sendo preciso processá-lo para aumentar sua vida útil (CAVALCANTI MATA; DUARTE; ZANINI, 2005).

A turbidez dos sucos de fruta surge imediatamente após o seu processamento, e geralmente é considerada o produto de partículas suspensas de pectina provenientes da parede celular das plantas e de outros materiais como celulose, hemicelulose, lignina e amido, além de proteínas, taninos, etc. Assim, a maioria das bebidas de frutas processadas

industrialmente são clarificadas durante a produção a fim de evitar a turbidez indesejável e sedimentos no produto final, podendo ser realizada através da adição de enzimas pectinolíticas e agentes clarificantes. Além da redução da turbidez, as enzimas pectinolíticas acarretam o aumento da produtividade pela liquefação da polpa e a melhor filtrabilidade dos sucos (KEMPKA; PRESTES; ALVIERO, 2013).

Assim este estudo objetivou clarificar o suco de Cajá utilizando pectinases de *Aspergillus aculeatus* URM4953 produzidas por fermentação em estado sólido com o auxílio de planejamento fatorial ².

MATERIAIS AND MÉTODOS

Todos os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de biotecnologia do CENLAG da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) na Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG).

Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo

O fungo *Aspergillus aculeatus* URM4953 foi cedido pela micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, sendo preservado em óleo mineral e mantido 28°C em Czapek Dox Agar. O inóculo de esporos foi obtido por crescimento em tubos contendo Czapek Dox Agar durante 7 dias a 30 °C. Os esporos foram coletados com a adição 3 mL de solução de NaCl (0,9%) e Tween 80 (0,01%) previamente esterilizada.

Produção de pectinases por fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 5g de casca de maracujá (utilizado como substrato para a produção de pectinases) na granulometria de 0,5 a 2,0 mm, solução nutritiva (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de glicose/dextrose e 0,5% de pectina cítrica, em tampão citrato 0,1 M pH 5,5) e suspensão de esporos (o volume da suspensão de esporos introduzido no meio foi previamente padronizado, mediante a contagem em câmara de Neubauer, para atingir a concentração desejada de 107 esporos/mL) ambas calculadas para umidade inicial de 50%. A fermentação ocorreu por 96 horas a 30°C. O extrato enzimático foi obtido com a adição de 30 mL de tampão acetato pH 5,5 e pela maceração, seguido de filtração do substrato fermentado em gaze. O filtrado foi submetido a centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos para a separação das partículas insolúveis e esporos, o sobrenadante, denominado extrato bruto enzimático, foi armazenado e congelado a -20°C para posterior análise.

Atividades enzimáticas

Poligalacturonase: Foi determinada pelo método proposto por Miller (1959) com a reação de 500 μ L de uma solução

de pectina cítrica 1,0% preparada em tampão acetato pH 4,5, e 500 µL do extrato enzimático, incubando-se por 40 minutos a 50°C em banho-maria. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 100 µL da reação e adicionou-se a 1 mL de solução de DNSA (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico). A mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos até formação de cor, resfriada em banho de gelo, adicionado 5,0 mL de água destilada e agitado em vórtex. A absorbância foi medida a 540 nm contra branco em espectrofotômetro. Os dados obtidos foram plotados em uma curva padrão estabelecida com ácido α -D-galacturônico como açúcar redutor. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de α -D-galacturônico por minuto, segundo padrão estabelecido com ácido α -D-galacturônico.

Endo-poligalacturonase: Foi determinada por viscosímetro de Ostwald segundo o método de Tuttoello e Mill (1961). Misturou-se 5,5 mL de solução de pectina 2,5% em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5, com 250 µL do extrato enzimático. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada por 10 minutos a 50°C, ao passar desse período a reação foi interrompida por banho de gelo. O branco foi realizado substituindo o extrato enzimático por água destilada. Uma unidade viscosimétrica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a viscosidade inicial da solução do substrato em um minuto de reação.

Pectina liase: A atividade da PL foi determinada segundo Siessere, Fonseca e Said (1992), foi preparada uma mistura contendo 1mL de pectina cítrica 1% em tampão acetato, pH 4,5 e 1 mL do extrato enzimático e incubada a 40°C por 1 hora. Foi adicionado 3,5 mL de HCl 0,5 M para parar a reação. A leitura foi realizada a 235 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produtos urônicos por minuto, com base no coeficiente molar ($\epsilon_{235} = 5550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Pectina esterase: A PE foi determinada segundo Maciel et al. (2014), foi preparada uma mistura contendo 2,0 mL de pectina cítrica 1% em tampão acetato, pH 4,5 e 1,0 mL de extrato enzimático, esta foi incubada a 50°C durante 2 h. A reação foi interrompida em banho maria de água fervente por 3 minutos seguido de resfriamento em banho de gelo. Em seguida, os grupos carboxílicos foram titulados com solução de NaOH (0,01 M) com 10 µL de fenolftaleína (1%). Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 microequivalente de um grupo carboxílico em 60 minutos da reação.

Clarificação do suco de Cajá

O Cajá foi armazenado a -20°C até ser utilizado. O suco de Cajá foi extraído com a despopadeira Fruit Pulper 60

litros (DES-60 Braesi) seguido de peneiramento para remoção de resíduos remanescentes. A clarificação ocorreu misturando a 1 U de extrato bruto enzimático (em relação a atividade da PG) para cada 1 mL de suco de cajá. Utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central variando tempo (30, 40 e 50 min) e temperatura (30, 40 e 60°C). A clarificação foi realizada em frascos erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de suco sob agitação constante em banho maria. Após a clarificação foram determinadas a redução de viscosidade, por viscosímetro de Oswald; açúcares redutores (Miller,1959); sólidos solúveis totais (SST), por refratômetro analógico, e pH, analisado em medidor de pH digital. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades encontradas para as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 na fermentação em estado sólido utilizando a casca de maracujá como substrato, nas condições já descritas, foram: 2,61 U/mL da PG, 2,59 U/mL da endoPG, 43,5 U/mL da PE e 7,02 U/mL da PL. Alguns autores encontraram valores próximos ao deste trabalho para a atividade das pectinases. As atividades da PL e PG se aproximaram das obtida por Camargo, Dentillo e Cardello (2005) os quais obtiveram atividades de 7,57 e 2,37 U/ml, respectivamente. Eles utilizaram um meio com concentração de 2% de pectina cítrica, e o *Aspergillus* sp como produtor da enzima. Bueno, Oliveira e Gattás (2002) obtiveram atividade de 36,3 U/mL para pectina esterase de *Aspergillus* sp CFCF-0492 em meio de pectina cítrica, valor inferior ao obtido neste estudo com resíduo de maracujá.

A presença no extrato bruto enzimático de todas as enzimas de interesse comercial que compõem o complexo pectinolítico, indica alto grau de aplicação deste na clarificação de suco, uma vez que estas podem auxiliar na degradação das substâncias pectínicas existentes no suco. Além disso, a preparação comercial de pectinases contém todas as enzimas do complexo pectinolítico (ONGARATTO; VIOTTO, 2015).

A clarificação foi realizada baseada na atividade enzimática da PG, devido a maior importância hidrolítica. Os resultados obtidos no processo de clarificação estão representados na Tabela 1. As condições de 50°C durante 50 minutos, foram as que apresentaram melhor desempenho, com redução de viscosidade de 89,1%, mostrando alta performance do extrato bruto enzimático no processo de clarificação de suco de Cajá. A análise estatística revelou que a interação entre tempo e temperatura foi a única que apresentou efeito significativo (com $p < 0,05$) sobre a redução da viscosidade, sendo verificado um efeito positivo, mostrando assim que o aumento da temperatura e do tempo conjuntamente aumentou a redução de viscosidade do suco clarificado. Os valores de pH, açúcares redutores e sólidos solúveis totais não apresentaram efeito significativo.

A redução de viscosidade no presente trabalho mostrou-se superior aos valores encontrados por Piemolini-Barreto, Antônio e Echeverrigaray (2015), os quais estudaram o processo de clarificação no suco de uva e obtiveram redução de 63,20%, quando aplicada a preparação enzimática Pectinex®Ultra Color (PEC), e 50,70% ao utilizar o extrato bruto enzimático do *Kluyveromyces*

marxianus. Pan et al. (2015) encontraram resultados próximos aos deste estudo, ao utilizar poligalacturonases de *Neosartorya fischeri* P1, para a clarificação dos sucos de morango e maçã, encontrando diferentes resultados em relação a ambos sucos clarificados com maior redução do suco de maçã 90%, utilizando-se 1500 U/mL em 20 mL de suco.

Tabela 1. Características físico-químicas do suco de Cajá clarificado pelo complexo pectinolítico de *A. aculeatus* URM4953.

T (°C)	t (minutos)	RV (%)	pH	AR (mg/mL)	SST
40	40	82,69	2,9	20,29	9,6
40	40	82,69	2,91	19,38	9,6
40	40	80,12	2,9	19,26	9,6
40	40	80,65	2,89	18,81	9,6
50	50	89,10	2,91	18,33	9,4
50	30	80,38	2,93	19,18	9,6
30	50	80,32	2,9	19,18	9,8
30	30	85,60	2,91	18,33	9,6

*T:temperatura; t:tempo; RV: redução de viscosidade; AR: açúcares redutores; SST: sólidos solúveis totais

CONCLUSÃO

O extrato bruto apresentou atividades satisfatórias de todas as enzimas pectinolíticas de interesse comercial determinadas neste trabalho. No processo de clarificação do suco de cajá, as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 reduziram a viscosidade do suco em 89,10%, na condição de 50°C durante 50 minutos. Com exceção da redução da viscosidade os demais parâmetros físico-químicos não sofreram alterações significativas ($p < 0.05$). Assim as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 apresentaram grande potencial para possíveis aplicações industriais uma vez que promoveram a redução da viscosidade, o que implica em reduções de custos em processos industriais, e não alteraram as características físico-químicas do suco de cajá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUENO, M. C.; OLIVEIRA, E. M.; GATTÁS, A. L. E. Efeito das condições de cultivo sobre a produção de Poligalacturonase e Pectina esterase de *Aspergillus* sp. **Alim. Nutr.**, v. 13, n. 1, p. 93–102, 2002.

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

CAVALCANTI MATA, M. E. R. M.; DUARTE, M. E. M.; ZANINI, H. L. H. T. Calor específico e densidade da polpa de Cajá (*Spondias lutea* L.) com diferentes concentrações de sólidos solúveis sob baixas temperaturas. **Eng. Agríc.**, v. 25, n. 2, p. 488–498, 2005.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 1, p. 135–141, 2009.

DEY, T. B.; ADAK, S.; BHATTACHARYA, P.; BANERJEE, R. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 591–595, nov. 2014.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

KEMPKA, A. P.; PRESTES, R. C.; ALVIERO, T. Clarificação de suco de maçã de dois cultivares utilizando tratamento enzimático e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 137–146, 2013.

MACIEL, M. H. C.; HERCULANO, P. N.; FERNANDES, M. J. S.; PORTO, T. S.; LIMA, J. S.; MAGALHES, O. C.; SILVA, L. R. C.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Pectinolytic complex production by *Aspergillus niger* URM 4645 using yellow passion fruit peels in solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 32, p. 3313–3322, 2014.

MARTOS, M. A.; BUTIUK, A. P.; ROJAS, N. L.; HOURS, R. A. Purification and characterization of a

polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 587–594, 2014.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade e os teores de fibra e pectina em suco de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 231–238, 2015.

PAN, X.; LI, K.; MA, R.; SHI, P.; HUANG, H.; YANG, P.; MENG, K.; YAO, B. Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. **Food Chemistry**, v. 188, p. 569–575, 2015.

PIEMOLINI-BARRETO, L. T.; 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, 27 maio 2015.

REHMAN, H. U.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 387–391, 2012.

SIESSERE, V.; FONSECA, V.; SAID, S. Extracellular polygalacturonases from *Penicillium frequentans*: separation and regulatory aspects. **Journal of Phytopathology**, v. 138, n. 1992, p. 1801–1805, 1992.

SOUZA, R. L. a.; OLIVEIRA, L. D. S. C.; SILVA, F. L. 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.

TUTTOBELLO, R.; MILL, P. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, v. 79, p. 57–64, 1961.

UENOJO, M.; GLAUCIA, E.; PASTORE, M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.