

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELISA DE AQUINO ROAS  
EMILY XAIANE NUNES CORREIA

**CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASE OBTIDA POR CULTIVO EM ESTADO  
SÓLIDO DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* EM FARELO DE TRIGO E BAGAÇO  
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**DOURADOS-MS  
2024**

ELISA DE AQUINO ROAS  
EMILY XAIANE NUNES CORREIA

**CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASE OBTIDA POR CULTIVO EM ESTADO  
SÓLIDO DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* EM FARELO DE TRIGO E BAGAÇO  
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte das exigências do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo  
Simões Ribeiro Leite.

**DOURADOS-MS  
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C824c Correia, Emily Xaiane Nunes

CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASE OBTIDA POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* EM FARELO DE TRIGO E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR [recurso eletrônico] / Emily Xaiane Nunes Correia, Elisa de Aquino Roas . -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Resíduos agro-industriais. 2. Cultivo em estado sólido. 3. Fungos termófilos. 4. Enzimas pectinolíticas. I. Roas , Elisa de Aquino . II. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**ELISA DE AQUINO ROAS  
EMILY XAIANE NUNES CORREIA**

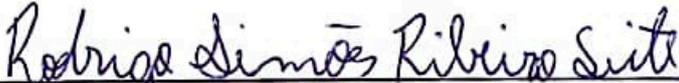
**CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASE OBTIDA POR CULTIVO EM ESTADO  
SÓLIDO DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* EM FARELO DE TRIGO E  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

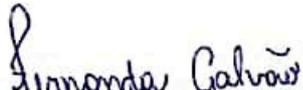
Trabalho de Conclusão de Curso  
aprovado pela Banca Examinadora  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia, da  
Universidade Federal da Grande  
Dourados.

Orientador: Dr. Rodrigo Simões Ribeiro  
Leite

Aprovado em: 22/11/2024

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
FERNANDA GALVÃO  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
ALESSANDRO MINILLO  
Membro

*“I got a river for a soul”*

*(One Direction)*

## AGRADECIMENTOS

**De:** Elisa de Aquino Roas

Gostaria de expressar minha gratidão primeiramente aos meus pais, Marcelo e Solange, por sempre terem estado ao meu lado e por me permitirem chegar até aqui. Sem a ajuda e o apoio de vocês, nada disso seria possível, e sou extremamente grata por tudo. Também não posso deixar de mencionar meu bisavô, Natalício Roas. Sem as horas de conversa e as histórias infantis contadas antes de dormir, eu certamente não seria quem sou hoje.

Ao meu namorado e fiel escudeiro, Guilherme, meu mais sincero obrigada. Obrigada por ter passado horas e horas me escutando falar sobre fungos, bactérias e outros assuntos dos quais desconhece, apenas para me ver feliz. Seu apoio e carinho tornaram tudo possível. Ter você ao meu lado me motiva e inspira todos os dias.

À minha querida e amada dupla, Emily, sem você eu estaria perdida, e a graduação seria muito mais difícil e menos divertida. Você é luz, e sou grata por tudo. Obrigada por cada dificuldade e desafio que superamos juntas.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pelo carinho, pelas conversas e por suas orientações ao longo desses anos. Sua dedicação à docência foi um grande aprendizado e possibilitou que este trabalho fosse realizado.

Por fim, agradeço ao Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de ensinamento, risadas e companheirismo que enriqueceram minha formação.

*“A dívida é o princípio da sabedoria”*  
*(Aristóteles)*

## **AGRADECIMENTOS**

**De:** Emily Xaiane Nunes Correia

Primeiramente, agradeço a Deus, pela minha vida, pela força, sabedoria e saúde ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, Éder e Talita, minha gratidão eterna pelo amor, apoio e por acreditarem em mim desde o início, mesmo distantes vocês sempre estiveram comigo, me incentivando a continuar e buscar o melhor de mim. Este é um passo que dou também por vocês.

Ao meu namorado, José, pela paciência, compreensão e apoio em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis. Seu apoio e encorajamento foram essenciais para que eu pudesse me manter firme e focada.

À minha amiga e dupla, Elisa, pelo companheirismo e pela parceria em cada desafio que enfrentamos juntas. Sua amizade foi fundamental para tornar essa jornada mais significativa.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório, Krysla e Camila, pelos momentos de risada, companheirismo, e apoio no laboratório. Vocês tornaram o ambiente de trabalho mais acolhedor e os dias mais alegres. Sou muito grata por cada experiência que compartilhamos.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pelo suporte e pela orientação. Sua dedicação e ensinamentos foram essenciais para que este trabalho fosse realizado.

Ao Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de ensinamentos e companheirismo.

Por fim, meu agradecimento a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste curso, seja com apoio, amizade e incentivo. Cada um de vocês faz parte desta conquista, eu sou imensamente grata por terem compartilhado essa jornada comigo.

## RESUMO

As pectinases são biocatalisadores essenciais para a indústria de alimentos e bebidas, atuando na redução de turbidez e viscosidade de sucos de frutas, vinhos e polpas, melhorando a filtração e as características físicas desses produtos. No entanto, o alto custo de produção dessas enzimas limita sua aplicação em larga escala. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar pectinases produzidas por cultivo em estado sólido do fungo filamentosso *Thermoascus aurantiacus*, utilizando resíduos agroindustriais, como o farelo de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar, como substratos. A maior produção de pectinase por *T. aurantiacus* foi obtida em 72 horas de cultivo com 168,39 U/g. A enzima apresentou maior atividade catalítica em pH 3,5 e temperatura de 60°C. As pectinases produzidas foram estáveis na faixa de pH de 4,5 a 7,0, e, quanto à termoestabilidade, a enzima manteve mais de 90% da atividade inicial entre 30 a 45°C após 1 hora de incubação. O extrato enzimático também exibiu atividades de outras enzimas, como a amilase (64,57 U/g de substrato), endoglucanase (181,32 U/g de substrato),  $\beta$ -glicosidase (75,72 U/g de substrato) e xilanase (2069,24 U/g de substrato). Esses resultados indicam que o fungo *T. aurantiacus* é uma fonte promissora de pectinases, celulasas e hemicelulasas, com potencial para aplicações em diversos processos industriais.

**PALAVRAS-CHAVES:** Resíduos agro-industriais; Cultivo em estado sólido; Fungos termófilos; Enzimas pectinolíticas.

## ABSTRACT

Pectinases are essential biocatalysts for the food and beverage industry, acting to reduce the turbidity and viscosity of fruit juices, wines and pulps, improving filtration and the physical characteristics of these products. However, the high cost of producing these enzymes limits their application on a large scale. In this context, this study aims to characterize the pectinases produced by solid-state cultivation of the filamentous fungus *Thermoascus aurantiacus*, using agro-industrial waste such as wheat bran and sugar cane bagasse as substrates. The highest production of pectinase by *T. aurantiacus* was obtained in 72 hours of cultivation with 168.39 U/g. The enzyme showed greater catalytic activity at pH 3.5 and a temperature of 60°C. The pectinases produced were stable in the pH range of 4.5 to 7.0 and, in terms of thermostability, the enzyme maintained more than 90% of its initial activity between 30 and 45°C after 1 hour of incubation. The enzyme extract also showed activities of other enzymes, such as amylase (64.57 U/g of substrate), endoglucanase (181.32 U/g of substrate),  $\beta$ -glucosidase (75.72 U/g of substrate) and xylanase (2069.24 U/g of substrate). These results indicate that the *T. aurantiacus* fungus is a promising source of pectinases, cellulases and hemicellulases, with potential applications in various industrial processes.

**KEYWORDS:** Agro-industrial waste; Solid-state cultivation; Thermophilic fungi; Pectinolytic enzymes.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Microrganismos.....	12
2.2. Preparo do inóculo.....	12
2.3. Produção de pectinase por Cultivo em Estado Sólido (CES).....	12
2.4. Extração da enzima.....	13
2.5. Determinação da atividade enzimática.....	13
2.6. Caracterização bioquímica de pectinase produzida em CES.....	13
2.6.1. Efeito do pH e da temperatura.....	13
2.7. Avaliação do perfil catalítico do extrato enzimático.....	13
2.8. Análise estatística.....	14
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>14</b>
3.1. Produção de pectinase por CES do fungo <i>T. aurantiacus</i> .....	14
3.2. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática.....	15
3.3. pH e temperatura de estabilidade.....	16
3.4. Perfil catalítico do extrato enzimático.....	18
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>20</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores que aceleram a velocidade das reações químicas, que não poderiam ocorrer de forma espontânea em condições normais de temperatura e pressão. As enzimas reduzem a energia de ativação necessária para que as reações químicas ocorram. Assim, existem diversas biomoléculas que são responsáveis por catalisar diferentes tipos de reações, dentre elas estão presentes as enzimas pectinolíticas (MELO, 2021).

As pectinases foram umas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente. Por volta de 1930, começaram a ser empregadas na produção de vinhos e sucos de frutas, mas somente na década de 1960, com os avanços da biotecnologia e os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais, ganharam destaque comercial (UENOJO & PASTORE, 2007).

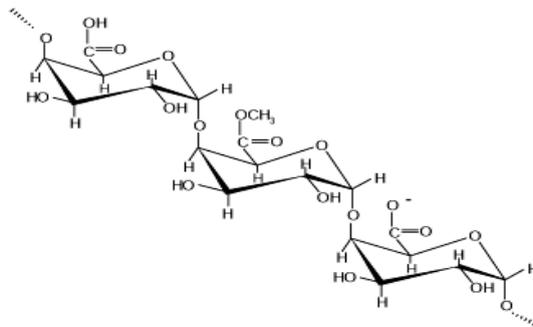
A adição de pectinases no processamento de sucos de frutas e bebidas, resultam na redução da turbidez e viscosidade, melhorando a filtração e as características físicas desses produtos (ISHII, 2014). Outra aplicação das pectinases, é na indústria de produção de óleos essenciais, estes estão localizados no albedo das frutas cítricas e contém hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos), compostos oxigenados (aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas e fenóis) e resíduos não voláteis (ceras, flavonóides e ácidos graxos). Dessa forma, com a aplicação das pectinases, os complexos pectina-proteína são hidrolisados, aumentando assim o rendimento e diminuindo o tempo de processamento, e por fim, melhorando a qualidade do produto final (SANTOS, 2007).

As pectinases podem ser obtidas a partir de fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Essas enzimas são utilizadas em processos de maceração e atuam sobre substâncias conhecidas como pectina, que são polissacarídeos complexos de alta massa molecular, encontrados em plantas superiores. A pectina está presente na parede celular primária e constitui grande parte da lamela média, localizada entre as células das plantas jovens. Ela contribui para a integridade estrutural das plantas (PEDROLLI, 2009). A pectina é um heteropolissacarídeo e apresenta vários açúcares em sua composição, porém pode haver uma variação em relação aos fatores ambientais e métodos de extração (CANTERI et al., 2012). A pectina é um componente presente principalmente em frutas cítricas, uvas e maçãs (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009)

O principal componente da molécula da pectina é o ácido D-galacturônico em sua forma de homopolímero unidos por ligações  $\alpha$ -(1,4) (CANTERI et al., 2012), em que proporções variáveis dos grupos ácidos estão presentes como ésteres metoxil, enquanto uma certa quantidade de açúcares neutros podem estar presentes como cadeias laterais

(VORAGEN et al., 2009) (Figura 1). Estas cadeias principais contêm resíduos de ramnogalacturonanas I e II, que consistem em unidades de ácido galacturônicos alternados com unidades específicas de ramnose (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

**Figura 1-** Estrutura química da cadeia de pectina



Fonte: BRANDÃO; ANDRADE, 1999

O grau de metoxilação é um fator fundamental para a aplicação das pectinas na indústria, uma vez que interfere nas propriedades funcionais dessa molécula, mais precisamente na sua habilidade em gelificar (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009). De modo geral, as pectinas são subdivididas em dois tipos, com alto grau de metoxilação (>50%) e baixo grau de metoxilação (<50%) (BRANDÃO & ANDRADE, 1999). Pectinas com elevado grau de metoxilação possuem rápida geleificação e são tipicamente extraídas em pH 2,5 a 100°C por 45 minutos. As pectinas com velocidades média ou lenta de gelificação são extraídas em temperaturas mais baixas por um período de tempo mais longo, como 60°C em 4 horas (CANTERI et al., 2012).

A pectina é utilizada principalmente na indústria alimentícia como agente gelificante, espessante e estabilizante na produção de geleias, iogurtes, bebidas lácteas e sorvetes (VORAGEN et al., 2009). Grande parte da pectina utilizada na indústria é proveniente de cascas de frutas cítricas e de bagaço da maçã. As pectinas também são usadas em produtos não comestíveis, como na indústria farmacêutica e cosméticos (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

Enzimas obtidas a partir de microrganismos apresentam vantagens como reduzindo tempo de produção, não necessitam de amplos espaços e podem ser produzidas a partir de cultivo em diversos substratos como resíduos agroindustriais (MARTINS, 2006). As enzimas obtidas de microrganismos podem ser produzidas por cultivo submerso ou em estado sólido (SILVA et al., 2021).

O cultivo em estado sólido (CES) é um processo utilizado para o crescimento microbiano em substratos sólidos com pouca ou nenhuma água aparente (ALVES, 2021). O CES é um processo vantajoso pois é de baixo custo em questão de matéria-prima, utiliza pouca água, simula o habitat natural de microrganismos filamentosos e resulta em enzimas mais estáveis a variações de temperatura e pH (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Essa técnica de cultivo apresenta algumas limitações, tais como a dificuldade de controlar o crescimento microbiano e os parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração, concentração de nutrientes e formação de produtos por conta da sua heterogeneidade (SANTOS, 2011).

Os resíduos agroindustriais são excelentes alternativas para serem utilizados como substratos em CES, pois são ricos em polissacarídeos, como a celulose, hemicelulose e pectina, que podem ser transformados em açúcares simples e absorvidos pelos fungos, além de ser uma opção de baixo custo e de fácil acesso (ALENCAR et al., 2020).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar as pectinases produzidas por cultivo em estado sólido do fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus*, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Microrganismos**

Para este trabalho foi utilizado o fungo filamentosso *Thermoascus aurantiacus*. O microrganismo foi isolado de serapilheira de um fragmento de Mata Atlântica Semidecidual (Mata do Azulão) localizado em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, sendo identificado pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática Fúngica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, IB/UNESP Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil. A cepa utilizada foi armazenada no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), sendo mantida em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio ágar *Sabouraud dextrose*, sob condições controladas de temperatura 5°C.

### **2.2. Preparo do inóculo**

O fungo *T. aurantiacus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio ágar *Sabouraud Dextrose*, mantido por um período de 48 horas a 45°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônia). A inoculação do fungo no substrato (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão (COSTA et al., 2019).

### **2.3. Produção de pectinase por Cultivo em Estado Sólido (CES)**

O substrato escolhido para o cultivo, foi farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, sendo estes divididos em 50% de cada. Nestes substratos separados, foram realizadas a limpeza de impurezas, pela lavagem executada três vezes consecutivas de cada e, em seguida, o substrato foi submetido a secagem na estufa por 50°C por 48 horas. Após a lavagem e secagem, 2,5 g de cada substrato foram colocados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e, em seguida, umedecidos com 4,5 mL de solução nutriente. Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave (20 min, 121°C, 1 atm). A umidade inicial foi estimada em 65%, e a temperatura foi mantida a 45°C. As amostras foram retiradas a cada 24 h, totalizando 168 h de cultivo. Todos os ensaios foram todos realizados em triplicata (GARCIA et al., 2015).

## **2.4. Extração da enzima**

O extrato enzimático foi obtido a partir dos resíduos miceliados, pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer, seguido de maceração por 10 min. Em seguida, os frascos foram agitados por 1 hora a 150 rpm. As amostras foram filtradas em tecido de náilon e centrifugadas a 15000 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios seguintes (COSTA et al., 2019).

## **2.5. Determinação da atividade enzimática**

A atividade de pectinase foi determinada com 0,2 mL de extrato enzimático, 0,8 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, contendo 1% de pectina cítrica, reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 540 nm pelo método de DNS descrito por Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto de reação.

## **2.6. Caracterização bioquímica de pectinase produzida em CES**

### **2.6.1. Efeito do pH e da temperatura**

Para a determinação do pH ótimo, foi realizada a quantificação da atividade enzimática a 50°C em diferentes valores de pH, sendo estes entre 3,0 e 8,0, foi utilizado o tampão McIlvaine (0,1M). A temperatura ótima foi determinada pela mensuração da atividade enzimática em valores de temperatura de 30-90°C no pH ideal da enzima. A estabilidade do pH foi quantificada ao incubar a enzima por 24 h em diferentes valores de pH a 25°C utilizando os tampões McIlvaine 0,1M (3,0-8,0), Tris-HCl 0,1M (8-8,5) e glicina-NaOH 0,1M (8,5-10,5). A termoestabilidade da enzima foi analisada a partir da incubação por 1 hora em diferentes temperaturas de 30-80°C. As atividades residuais foram mensuradas sob condições ótimas da enzima (COSTA et al., 2016).

## **2.7. Avaliação do perfil catalítico do extrato enzimático**

As atividades de Endoglucanase (CMCase), xilanase e amilase foram quantificadas usando 3% de carboximetilcelulose (Sigma, C5678), 1% xilana (Sigma, Beechwood) e 1% de amido de milho, respectivamente, como substratos. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS, descrito no item anterior. A atividade da  $\beta$ -glicosidase foi medida com o substrato sintético p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mM, Sigma). Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto de reação (GARCIA et al. 2015).

### 2.8. Análise estatística

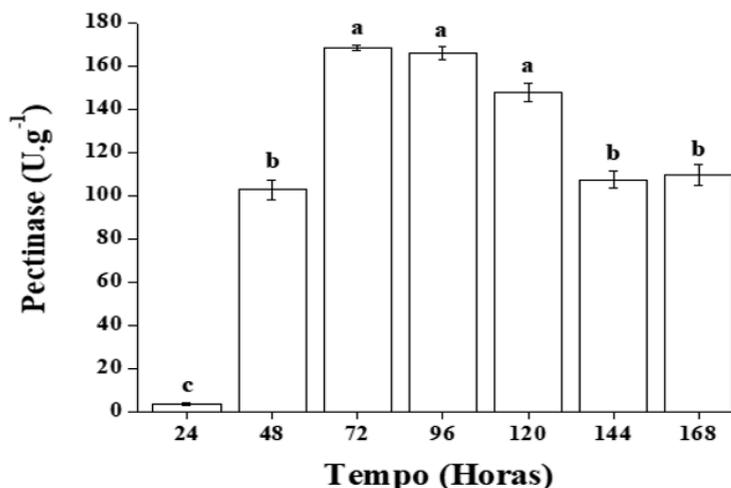
Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como a média de três ensaios independentes. As análises estatísticas dos dados incluíram uma ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey com 5% de significância.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Produção de pectinase por CES do fungo *T. aurantiacus*

A enzima pectinase atingiu sua máxima produção em 72 horas de cultivo, com 168,39 U/g (ou 16,83 U/mL). No entanto, esse pico foi estatisticamente semelhante ao observado em 96 horas e em 120 horas (figura 2).

**Figura 2:** Produção de pectinase pelo fungo *T. aurantiacus* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50%) a 45°C contendo 65% de umidade inicial.



Os fungos filamentosos destacam-se em relação às bactérias na produção de enzimas em Cultivos em Estado Sólido (CES) devido às suas características fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas. Essas características permitem uma melhor adaptação a condições de baixa umidade, além de facilitarem o crescimento sobre diferentes substratos. Os resíduos agroindustriais são compostos principalmente por pectina, celulose, hemicelulose e lignina, o que justifica a produção de enzimas que degradam esses polímeros por CES, utilizando resíduos agroindustriais como substrato (SANTOS et al., 2018).

Trabalhos anteriores confirmam a elevada produção de pectinase pelo fungo *T. aurantiacus*, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio (MARTINS et al., 2001).

Os subprodutos agroindustriais como o farelo de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar, vem sendo utilizados como fontes alternativas para a produção de enzimas industriais, devido à sua disponibilidade local e uma opção de baixo custo comercial, especialmente para produção de enzimas em larga escala (SILVA, 2022).

### **3.2. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática**

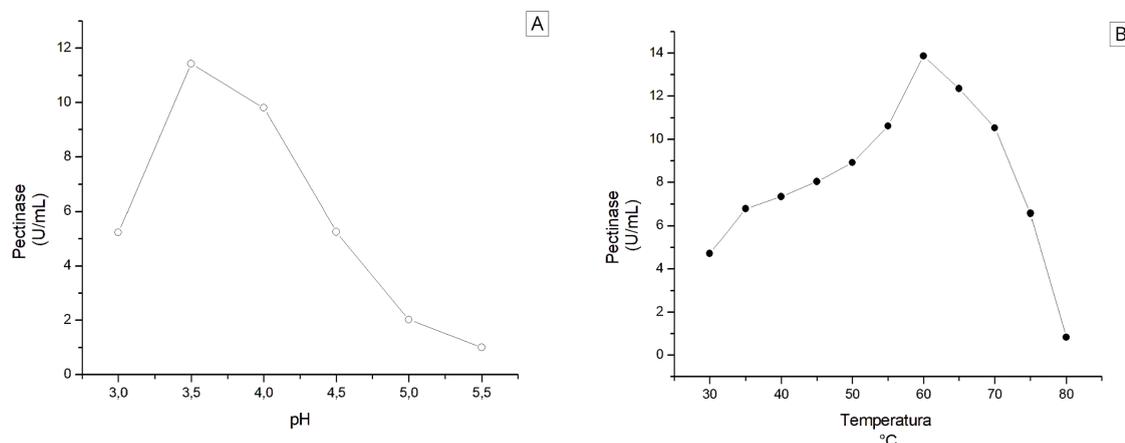
A pectinase de *T. aurantiacus* apresentou maior atividade catalítica em pH 3,5 e temperatura em 60°C (Figura 3).

Segundo Afzia et al. (2024), a pectinase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* apresentou atividade máxima em pH 4,0, outros estudos relataram que as enzimas pectinolíticas mostram maior atividade enzimática na faixa de pH 4,0 a 7,0 (KC et al., 2020; MACIEL et al., 2011), resultados próximos ao presente estudo.

O pH é um parâmetro importante para qualquer processo biológico, podendo haver valor de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de diferentes microrganismos. Os fungos, geralmente possuem condições favoráveis de desenvolvimento em pH mais ácido (4,5-5,0) (SANTOS, 2007).

As variações de pH podem alterar a conformação das enzimas, pois, como as outras proteínas, elas possuem grupos ionizáveis nos resíduos de aminoácidos. Essas mudanças conformacionais afetam a atividade catalítica enzimática, quando expostas em condições de pH desfavorável (GIONGO, 2006).

**Figura 3:** A) Efeito do pH ótimo de pectinase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* em cultivo de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50%) a 45°C, contendo 65% de umidade, em 72h de cultivo. B) Efeito da temperatura ótima de pectinase produzida.



O *T. aurantiacus* é um fungo termófilo, com crescimento ótimo em temperaturas elevadas (KALOGERIS et al., 2003). Silva (2019), relatou uma temperatura ótima entre 65 e 70°C para pectinase produzida por *Rasamsonia emersonii* BC, produzida por CES utilizando farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar como substrato.

As pectinases são amplamente utilizadas em diversos processos, como na clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, refinamento de fibras vegetais, extração de óleos, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel e tratamento do suco de uva para indústria vinícolas. Devido à natureza desses processos, altas temperaturas costumam ser empregadas. No entanto, na maioria dos casos, o material submetido ao aquecimento precisa ser resfriado antes do tratamento enzimático. O uso de pectinases termoestáveis, como as produzidas por *T. aurantiacus*, poderia eliminar essa etapa de resfriamento, reduzindo significativamente os custos operacionais. Isso tornaria o processo mais eficiente, tanto em termos de tempo quanto de recursos, e promoveria um melhor aproveitamento das enzimas em escala industrial (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008).

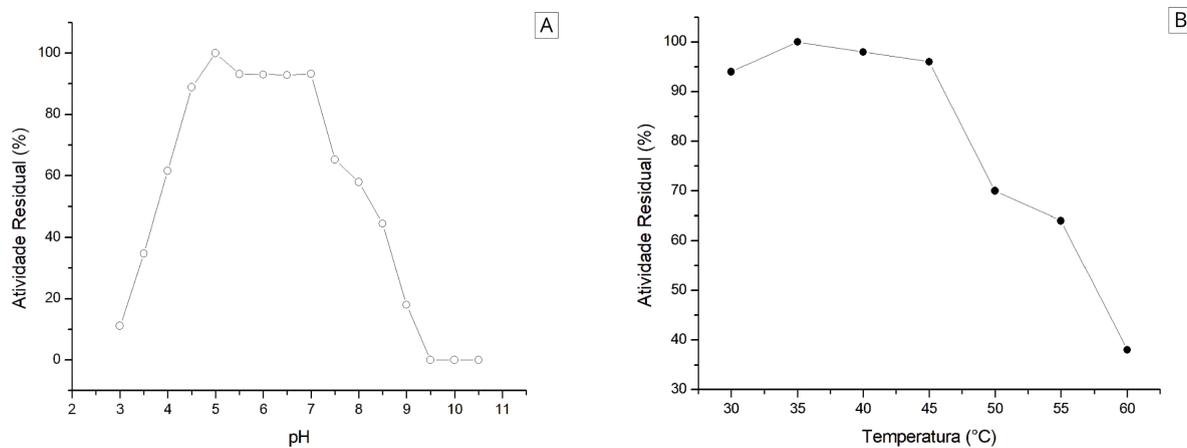
### 3.3. pH e temperatura de estabilidade

Em relação à estabilidade do pH, a pectinase produzida por *T. aurantiacus* manteve sua atividade inicial superior a 85% na faixa de pH de 4,5 a 7,0 (Figura 4A). Enzimas pectinolíticas fúngicas, geralmente apresentam maior estabilidade em meio ácido

(OLIVEIRA, 2023). Guimarães et al. (2023), realizaram um estudo avaliando o efeito do pH na estabilidade da pectinase de *Aspergillus japonicus*, mantendo 88, 84 e 72% da atividade em valores pH 3,0, 4,0 e 5,0, respectivamente, resultados que se assemelham aos observados no presente trabalho.

**Figura 4:** A) Efeito do pH de estabilidade de pectinase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* em cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50%) a 45°C, contendo 65% de umidade, em 72h de cultivo.

B) Efeito da temperatura de estabilidade de pectinase produzida.



A termoestabilidade da pectinase foi determinada pela medição da atividade residual. Para as pectinases, a temperatura entre 30 a 45°C, mantiveram mais de 90% da atividade inicial, em 1 hora de incubação, após esse período a enzima em 50°C manteve 70% de sua atividade e perdeu cerca de 40% de sua atividade em 60°C (Figura 4B). De acordo com Ezech et al. (2023), as pectinases de *Yarrowia phangngaensis* demonstraram termoestabilidade entre 20 a 50°C, mantendo mais de 90% de sua atividade inicial. Entretanto, a 60°C, observou-se que a enzima perdeu cerca de 40% de sua atividade inicial.

As enzimas produzidas por microrganismos termófilos geralmente apresentam maior termoestabilidade, devido a um maior número de ligações covalentes como as dissulfeto, e de interações não covalentes, incluindo ligações hidrofóbicas, eletrostáticas, iônicas e de hidrogênio (CAVALHEIRO et al., 2023).

### 3.4. Perfil catalítico do extrato enzimático

Além da pectinase, o extrato enzimático produzido pelo fungo *T. aurantiacus* apresentou também atividade de outras enzimas. Dentre elas: amilase, com atividade de 6,45 U/mL (ou 64,57 U/g de substrato), endoglucanase, com atividade de 18,13 U/mL (ou 81,32 U/g de substrato),  $\beta$ -glicosidase, com atividade de 7,57 U/mL (ou 75,72 U/g de substrato) e xilanase, com atividade de 206,91 U/mL (ou 2069,24 U/g de substrato) (Tabela 1).

Dentre as enzimas avaliadas, destaca-se a produção de xilanase e endoglucanase pelo fungo *T. aurantiacus*. Costa et al. (2016), avaliou a produção de xilanase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* cultivado em resíduos agroindustriais como substrato, assim, a maior produção de xilanase foi de 1701,9 U/g de substrato seco. Silva (2023), relatou a produção de endoglucanase pelo fungo *Pleurotus djamor* em diferentes substratos agroindustriais, obtendo 9,94 U/g em farelo de trigo e 52,92 U/g em bagaço de cana-de-açúcar.

Silva et al. (2020), relataram a produção de amilase em diferentes resíduos de frutas, nos cultivos resíduo de manga houve atividade máxima de 26,75 U/g de substrato seco e com o de maracujá foi de 21,69 U/g de substrato seco, com *Lichtheimia ramosa*. Valores inferiores comparados com o presente trabalho.

Garcia et al. (2018), relataram maior produção de  $\beta$ -glicosidase pelo fungo *L. ramosa* em farelo de trigo, com atividade máxima de 162,2 U/g de substrato. Zanchetta (2012), demonstrou que o fungo *Humicola grisea var. thermoidea* produziu uma quantidade elevada de  $\beta$ -glicosidase, atingindo 124,9 U/g, quando cultivado em bagaço de cana e farelo de trigo. Esses valores são superiores aos encontrados no presente estudo. A diferença pode ser explicada pela ausência de parâmetros otimizados de cultivo, como pH, temperatura e umidade, o que abre espaço para trabalhos futuros.

O farelo de trigo é um excelente substrato para crescimento microbiano e produção de enzimas, por sua composição ser rica em carboidratos, lipídios, minerais, proteínas e vitaminas, que são facilmente absorvidos pelos microrganismos, especialmente os fungos filamentosos (VIDEIRA et al., 2021).

As enzimas obtidas no presente trabalho, podem ser aplicadas em diversos processos industriais, como na produção de sucos, vinhos, cervejas, detergentes, papel e celulose, além de serem utilizadas como aditivos para rações de animais e na lavagem de tecidos pela indústria têxtil (GARCIA et al., 2018). Dessa forma, os resultados estimulam a continuidade do presente trabalho, no sentido de otimizar a produção desses biocatalisadores, empregando

o farelo de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar como substrato para o CES do fungo *T. aurantiacus*.

**Tabela 1:** Perfil catalítico do extrato enzimático produzido por *T. aurantiacus* para produção de pectinase em cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50%) a 45°C, contendo 65% de umidade, em 72h de cultivo.

<b>Enzimas</b>	<b>U/mL</b>	<b>U/g de substrato seco</b>
Amilase	6,45	64,57
Endoglucanase	18,13	181,32
$\beta$ -glicosidase	7,57	75,72
Xilanase	206,91	2069,24
Pectinase	17,01	170,05

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o fungo termófilo *T. aurantiacus* é capaz de produzir uma quantidade considerável de pectinase por cultivo em estado sólido, utilizando meios de baixo custo em reduzido tempo de cultivo.

A pectinase produzida apresentou alta estabilidade estrutural, possibilitando a utilização destes biocatalisadores em processos industriais.

O perfil catalítico do extrato enzimático produzido pelo fungo *T. aurantiacus* nas condições de cultivo descritas no presente trabalho, apresenta elevada atividade de celulasas e xilanase, o que habilita sua utilização em processos de degradação de biomassa vegetal, seja na produção de etanol de segunda geração, ou na produção de ração animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZIA, N. et al. 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, n. 100166, p. 100166, 2024.
- ALENCAR, V .N. S. et al. Resíduos agroindustriais: uma alternativa promissora e sustentável na produção de enzimas por microrganismos. In: *Ciência, Tecnologia e Inovação: do campo à mesa*. Anais... Instituto Internacional Despertando Vocações, 2020.
- ALVES, Y. L. Produção de enzimas utilizando resíduos de café como substrato em processos fermentativos: uma revisão. 2021. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021.
- ARAÚJO, M. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.
- BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 9, n. 3, p. 38–44, 1999.
- BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal Biology Reviews*, v. 22, n. 3-4, p. 120-130, 2008.
- CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.
- CAVALHEIRO, G. F. et al. Catalytic properties of amylases produced by *Cunninghamella echinulata* and *Rhizopus microsporus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 95, n. 3, p. e20230187, 2023.
- COSTA, A. C. et al. Produção de xilanase por uma nova cepa de *Thermoascus aurantiacus*: obtenção de extrato enzimático com atividade celulolítica reduzida para aplicação em indústrias de papel e celulose. *Biosci. j. (Online)*, p. 1040-1048, 2016.
- COSTA, A. C. et al. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. *BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY*, p. 101161, 2019.
- EZEH, N. O. et al. Extracellular pectinase production from a novel *Yarrowia phangngaensis* XB3 grown on banana waste and its application in fruit juice clarification. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 47, n. 102614, p. 102614, 2023
- GARCIA, N. F. L. et al. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.18, 314-319, 2015.

- GARCIA, N. F. L. et al. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Industrial crops and products*, v. 122, p. 49–56, 2018.
- GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 2006.
- GUIMARÃES, N. C. A. et al. Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase using a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices. *Waste and biomass valorization*, v. 15, n. 1, p. 177–186, 2024.
- ISHII, H. A. Aplicações da pectinase na indústria de sucos. 2014. 35 f. Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- KC, S. et al. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, v. 6, n. 2, p. 59, 2020.
- KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1099–1104, 2003.
- MACIEL, M. D. H. C. et al. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 13, p. 2469–2475, 2011.
- MARTINS, E. S. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 9, p. 949–954, 2002.
- MARTINS, E. S. Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 2006.
- MARTINS, E. S.; Silva, D. ; Gomes, E. ; da Silva, R. . Produção de pectinases termoestáveis pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através da fermentação em estado sólido de resíduos agro-industriais. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001.
- MELO, N. E. T. Desenvolvimento e aplicações de pectinases como "ferramentas" biotecnológicas. 2021. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.
- OLIVEIRA, N. C. A. G. Produção, purificação e caracterização bioquímica de pectinases de *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus*: aplicação da enzima de *A. japonicus* na clarificação de sucos de frutas. 2023.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v. 10, p. 196-211, 2009.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 3, n. 1, p. 9–18, 2009.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al.. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 8, p. 912–919, ago. 2011.

SANTOS, S. F. M. Pectinases production by solid-state fermentation using cashew apple as substrate. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANTOS, F. R. S. Produção de  $\beta$ -glicosidase pelo fungo filamentosso *Lichtheimia ramosa* utilizando resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido (CES). 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2011.

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. 2018.

SILVA, G. O. Produção e caracterização de pectinases pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC e avaliação do efeito de sua aplicação em coquetel enzimático na sacarificação da palha da cana-de-açúcar. 2019.

SILVA, C. A. A. et al. Biotransformation of fruit residues via solid state bioprocess using *Lichtheimia ramosa*. *SN Applied Sciences*, v. 2, p. 861, 2020.

SILVA, M. D. Aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas. 2020. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

SILVA, M. C. Produção, purificação, caracterização e aplicações de uma nova protease e uma endoglucanase do fungo *Pleurotus djamor* PLO13. 2024. 171 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

SILVA, L.S. et al. Fermentação em estado sólido e submerso para produção de celulase: revisão bibliográfica. In: *Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria*. Anais... Instituto Internacional Despertando Vocações, 2021.

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

VIDEIRA, T. C. et al. Produção de pectinases por cultivo em estado sólido do fungo *Pycnoporus sanguineus* em resíduos agroindustriais. 2021.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectina, um polissacarídeo versátil presente nas paredes celulares das plantas. *Structural Chemistry*, v. 20, p. 263–275, 2009.

ZANCHETTA, A. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica. 2012.