



## ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DO BAGAÇO DE CAJÁ

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade<sup>1</sup>; Napoleão José de Oliveira Neto<sup>2</sup>; Emanuele Cardoso Dias<sup>1</sup>; Débora Karenine Lacerda Gervásio<sup>2</sup>; Melina Kehle Lins de Lima<sup>2</sup>; Sharline Florentino de Melo Santos<sup>3</sup>; Adna Cristina Barbosa de Sousa<sup>4</sup>; Andréa Farias de Almeida<sup>5</sup>

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Mestrado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba.
2. Graduando (a) do Curso de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba.
3. Professora Doutora do Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.
4. Professora Doutora do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba.
5. Professora Doutora do Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa – PB, Brasil.  
E-mail: andreaalm@cbiotec.ufpb.br.

### RESUMO

As indústrias alimentícias, envolvidas no processamento de frutas, produzem uma grande variedade de resíduos sólidos que podem ser utilizados no processo de fermentação em estado sólido (FES) para produção de pectinases, celulasas e proteases. Essas enzimas são produzidas naturalmente por diversos organismos, como bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas. São amplamente empregadas na indústria alimentícia, têxtil, de papel e celulose, entre outras. Dessa forma, objetivou-se avaliar a capacidade de produção enzimática através da FES utilizando como única fonte de carbono o bagaço de cajá *in natura* a partir do *Bacillus* sp., para demonstrar a potencialidade deste resíduo nos processos biotecnológicos. Para isto, foi necessário realizar a caracterização físico-química do bagaço de cajá, verificar a produção e a termoestabilidade das enzimas pectinolíticas, celulolíticas (FPases e CMCases) e proteolíticas produzidas no processo fermentativo ao longo de 120 horas, na temperatura de 30°C. Dentre as enzimas analisadas, a maior atividade pectinolítica foi observada às 72 horas, quando o extrato enzimático bruto foi incubado a temperatura de 35°C; já as melhores atividades celulolíticas foram observadas as 48 e 120 horas, nas temperaturas de incubação a 40° e 30°C para as FPases e CMCases, respectivamente. Quanto à atividade proteolítica, foi observado um comportamento equivalente da atividade quando incubada nas diferentes temperaturas. Os resultados comprovaram que o *Bacillus* sp. foi capaz de utilizar o bagaço de cajá como substrato e produzir enzimas com atividade enzimática ótima a 30°C para as pectinases e CMCases, e 40°C para as FPases e proteases.

**Descritores:** Fermentação; Resíduo Industrial; Pectinase; Celulase.

### STUDY OF PRODUCTION OF PECTINOLYTIC AND CELLULOLYTIC ENZYMES BY SOLID STATE FERMENTATION USING AS SUBSTRATE CAJA BAGASSE

ANDRADE ASA et al. Estudo da Produção de Enzimas Pectinolíticas e Celulolíticas por Fermentação em Estado Sólido a Partir do Bagaço de Cajá.



## ABSTRACT

Food industries involved in processing fruit, produce wide range of solid residue which may be used in the process of solid state fermentation for the production of cellulolytic, pectinolytic and proteolytic enzymes. These enzymes are naturally produced by many organisms such as bacteria, fungi, yeast, insects, nematodes, protozoa and plants. Are widely used in the food industry, textile, cellulose and paper industry, among others. Thus, the objective of this study was to evaluate the enzyme production capacity by solid state fermentation using as substrate caja bagasse (*Spondias mombin* L.) *in natura* from *Bacillus* sp. to demonstrate the potential in biotechnological processes of this solid residue generated fruit processing the mombin. The methodology sought to accomplish the physicochemical characterization of caja bagasse used in the fermentation process, analyses the production and thermostability of pectinolytic enzymes, cellulases (FPases and CMCases) and proteolytic produced in the fermentation process to over 120 hours cultivation, temperature of 30°C. Among the enzymes analyzed, the highest pectinolytic activity was observed at 72 hours when the crude enzyme extract was incubated at 35°C; We have the best cellulolytic activities were observed at 48 and 120 hours and the incubation temperature at 40° to 30°C for FPases and CMCases, respectively. It was also verified the best proteolytic activity, which was observed a similar behavior of activity when incubated at different temperatures. The results showed that the *Bacillus* sp. you are able to use the caja residue as carbon source and produce the enzymes with optimal enzymatic activity at 30°C for pectinases and CMCases and 40°C for FPases and proteases.

**Key-words:** Fermentation; Industrial Waste; Pectinase; Cellulase.

## INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias brasileiras envolvidas no processamento de frutas comestíveis para fabricação de produtos, como: sucos naturais e concentrados, polpas, extratos, frutos e doces em conserva, geleias, néctares e sorvetes, produzem uma grande quantidade de resíduos sólidos – cascas, fibras, sementes, entre outros – que quando descartados em grande quantidade pode acarretar sérios problemas ambientais.

Uma estratégia para o aproveitamento desses resíduos é a sua utilização como fonte de carbono em processos biotecnológicos, a exemplo a fermentação em estado sólido (FES) que se caracteriza por ser um processo fermentativo realizado em uma matriz sólida, configurada pela ausência ou pela baixa quantidade de água livre. Entretanto, o substrato utilizado deve ter quantidade de água suficiente, através da umidade da matriz, necessária ao desenvolvimento microbiano. A FES é bastante utilizada para produção de enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aromas. (1-2-3).



Nas regiões Norte e Nordeste, o cajá é um fruto bastante apreciado tanto na forma *in natura*, quanto na forma processada. É oriundo da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e possui composição média de 32,81% semente, 15,66% casca e 51,53% polpa, porém esses valores podem variar conforme condições ambientais e genótípicas, estado de maturação, tamanho, entre outros fatores (4-5).

A industrialização desse fruto remete a grande geração de resíduos, pois apenas a polpa é de interesse em seu processamento, e aproximadamente 50% de todo material processado pode ser utilizado em processos fermentativos para produção enzimática, como as amilases, proteases, xilanasas, celulases e pectinases (6).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo de enzimas que possuem a função de hidrolisar as substâncias pécticas – polissacarídeos encontrados na parede celular vegetal. Foi uma das primeiras enzimas a serem empregadas comercialmente. No mercado mundial, as pectinases correspondem a 10% da produção enzimática total e são produzidas por muitos organismos como bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas (7).

Já as enzimas celulolíticas ou celulases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise da celulose. No mercado mundial, as celulases correspondem a 8% da produção enzimática global, são produzidas por vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (8-9).

As enzimas proteolíticas ou proteases são responsáveis pela clivagem de peptídeos e por conduzir modificações seletivas e específicas em proteínas. Podem ser produzidas por plantas, animais e micro-organismos. Constituem uma classe muito importante na indústria e correspondem a cerca de 60% da produção enzimática global (10).

Os grupos enzimáticos mencionados anteriormente possuem diversas aplicações industriais, entre elas estão à indústria têxtil, de alimentos e sucos, de papel e celulose, de lavanderia e detergentes, dentre outras (2, 9, 11).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção das enzimas pectinolíticas, celulolíticas (FPases e CMCases) e proteolíticas através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cajá *in natura* a partir do *Bacillus* sp. para demonstrar a potencialidade nos processos biotecnológicos deste resíduo gerado no processamento do cajá.

## METODOLOGIA



## Preparo do resíduo

Como substrato da fermentação em estado sólido para produção enzimática foi utilizado o bagaço de cajá resultante do processamento do fruto na produção de polpa. Esse substrato foi cedido pela Indústria Polpas de Frutas Ideal, localizada na cidade de João Pessoa – PB.

O bagaço de cajá é uma mistura de cascas, fibras e sementes. Porém, teve-se o cuidado de selecionar apenas as cascas e fibras para serem utilizadas no processo. Após a seleção, o bagaço foi armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

## Caracterização do resíduo de cajá

O resíduo proveniente do processamento do cajá foi caracterizado quanto à/ao:

Teor de sólidos solúveis: foram adicionados 9mL de água destilada a 1g do bagaço de cajá em frasco *erlenmeyer* de 125mL. A suspensão permaneceu em mesa agitadora (SOLAB-SL-223) durante uma hora sob agitação de 200rpm. Seguida de filtração com bomba a vácuo (TECNAL-TE-0581), em funil de Buchner, usando papel filtro qualitativo (14 $\mu\text{m}$ ) para separar o bagaço do sobrenadante. A leitura foi realizada em refratômetro (NOVA – ABBE REFRACTOMETER), o resultado multiplicado por 10, devido à diluição (12).

Densidade aparente: 100g do bagaço foi colocado em proveta, sem compactá-lo, para verificar o volume ocupado e espaços vazios (13). A densidade aparente é expressa conforme a Equação 1.

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ (g)}{volume\ ocupado\ (mL)} \quad \text{Eq. (1)}$$

pH: preparou-se uma suspensão com 100mL de água e 10g de bagaço. Após homogeneização e precipitação dos sólidos, determinou-se o pH com potenciômetro digital (AKSO – AK90) previamente calibrado com soluções padrões (14).

Teor percentual de umidade: pesou-se aproximadamente 2g da amostra em placa de petri previamente seca, tarada e de massa conhecida. Em seguida, o conjunto amostra-recipiente foi colocado em estufa (OLIDEF-CZ) a  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. O procedimento foi realizado em triplicata. O teor percentual de umidade foi determinado pela Equação 2 (15).



$$Umidade (\%) = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra})}{\text{peso inicial da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Teor percentual de cinzas: pesou-se 2g do resíduo de cajá úmido em cadinho previamente calcinado a 600°C por 30 minutos e resfriado em dessecador. O conjunto resíduo-cadinho foi colocado em forno mufla (ASTEMEP-ICD 04A) a temperatura ambiente e iniciou uma rampa de temperatura de aquecimento de aproximadamente 9,6°C/minuto até a temperatura de 600°C (atingida em 60 minutos de aquecimento). Essa temperatura foi mantida por 3 horas. Em seguida, a temperatura foi reduzida a 200°C em no mínimo uma hora. O conjunto resíduo-cadinho foi levado ao dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado novamente. O procedimento foi realizado em triplicata. O teor de cinzas foi calculado pela Equação 3 (15).

$$Cinzas(\%) = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Teor de açúcares redutores totais (ART): em frasco erlenmeyer de 125mL contendo 10g do bagaço de cajá foi adicionado 20mL de água destilado e 5mL de HCl 1N. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB-SL-223) a 200rpm durante uma hora. Posteriormente, foi adicionado 2mL de NaOH 1N. A mistura foi filtrada com auxílio de uma bomba a vácuo (TECNAL-TE-0581), em funil Buchner, usando papel filtro qualitativo (14µm), a fim de separar o bagaço da solução contendo os açúcares. O teor de açúcares redutores presente na amostra foi determinado pelo método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico), onde adicionou 0,5mL da solução em tubo de ensaio e 2,5mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100°C por 10 minutos e resfriados em banho de gelo por cinco minutos. As amostras foram acrescidas com 3mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540nm. O branco foi feito utilizando água destilada no lugar da amostra. A solução de glicose em diferentes concentrações foi utilizada para determinar a curva padrão, a qual é usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra) (16).

### Micro-organismo



O micro-organismo empregado foi o *Bacillus* sp., linhagem isolada do solo canavieiro, cedido gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A cultura de *Bacillus* sp. foi mantida em meio sólido ágar Luria-Bertani em tubos inclinados com 3mL de meio (pH 6,8). A renovação das células foi feita periodicamente, realizada por repique em meio e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, armazenadas a 4°C.

### Inoculo

A cepa de *Bacillus* sp. foi inicialmente cultivada em frasco *erlenmeyer* de 125mL contendo 50mL de meio (Tabela 1) e o pH ajustado para 6,8. O inoculo foi preparado através da transferência, com alça de platina, de colônias isoladas a partir do tubo inclinado com meio sólido ágar Luria-Bertani, e incubado a 37°C, sob agitação de 150rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da densidade óptica do meio de cultivo a 600nm (D.O.600nm). Este cultivo foi utilizado como inoculo quando a D.O.600nm atingiu absorbância entre 0,6 e 0,8 (17).

**Tabela 1:** Composição do meio do inoculo.

Componentes	Concentração (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,390
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,080
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,001
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,197
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,002
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,015
Extrato de levedura	1,000
Sacarose	20,000

Fonte:18.

### Meio e condições de cultivo

O cultivo para produção enzimática foi realizado em frascos *erlenmeyers* de 250mL contendo 10g de bagaço de cajá suplementado com 9mL de solução nutriente (Tabela 2) e o pH ajustado para 6,8. Cada frasco recebeu 1mL do inoculo e foram incubados a 30°C. As amostras foram retiradas em intervalos de tempos regulares (0, 24, 48, 72, 96, 120) durante o processo, a fim de realizar as análises do cultivo.



**Tabela 2:** Composição do meio nutriente utilizado no cultivo.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,300
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,700
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,020
Sacarose	5,000
Extrato de levedura	1,000

Fonte: 18.

### **Obtenção do extrato enzimático**

Cada amostra retirada do cultivo recebeu 20mL de tampão acetato 0,1M, pH 5,0. O meio fermentado em suspensão foi colocado em mesa agitadora (SOLAB-SL-223) a 200 rpm durante uma hora. Em seguida, procedeu-se a filtração com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL-TE-0581), em funil Buchner, usando papel filtro qualitativo (14µm) para separar o resíduo da fermentação do sobrenadante contendo o extrato enzimático. O filtrado foi submetido à centrifugação a 2600rpm por 10 minutos para retirada dos particulados residuais. A amostra foi armazenada a 4°C para análises posteriores.

### **Análises do extrato enzimático**

O extrato enzimático foi submetido às seguintes análises:

pH: foi determinado com o auxílio de um potenciômetro digital (AKSO-AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

Proteínas totais: adicionou-se em um microtubo 10µL da amostra. 790µL de água Milli-Q e 200µL do reagente de Bradford (em triplicata). As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. O branco foi preparado em um microtubo com 800µL de água Milli-Q e 200µL do reagente de Bradford. A absorbância foi quantificada no comprimento de onda igual a 595nm. Empregou-se a albumina sérica bovina (1mg/mL) como padrão (19).

Ensaio quantitativo da atividade pectinolítica: nessa análise foi utilizada a casca do maracujá como substrato enzimático. Para isso, os maracujás foram lavados e higienizados. O flavedo e a polpa foram removidos. O albedo foi colocado em banho termostatizado (SOLAB-SL-150) a 90°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo até atingir



a temperatura ambiente. O albedo foi cortado em cubinhos com volume igual a  $0,5\text{cm}^3$  ( $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0,5\text{cm}$ ). Em seguida, armazenados a temperatura de  $-18^\circ\text{C}$  (20).

Para extração e hidrólise da pectina, cada tubo de ensaio contendo 4mL de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, previamente aclimatado a  $35^\circ\text{C}$ , recebeu um cubinho da casca de maracujá. Adicionou-se 0,5mL de extrato enzimático, prosseguindo a reação enzimática a  $35^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Terminada a reação, a glicose liberada foi estimada pela reação com ácido 3,5-dinitro salicílico, já descrita anteriormente. Uma unidade da atividade da pectinase foi definida pela quantidade de enzima que libera  $1\mu\text{mol}$  de glicose por minuto (21).

Determinação da atividade celulolítica total (FPase): nessa análise empregou-se como substrato o papel filtro Whatman nº1, cortado em tiras de  $1 \times 6\text{cm}$ . Cada tubo de ensaio recebeu uma tira de papel. Em seguida, adicionou-se 1mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8 e 0,5mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a  $50^\circ\text{C}$  durante 60 minutos em banho termostaticado (SOLAB-SL-150). A glicose liberada foi estimada pela reação com ácido 3,5-dinitro salicílico. Uma unidade da atividade da celulase é definida pela quantidade de enzima que libera  $1\mu\text{mol}$  de glicose por minuto (equivalente a 0,18mg de glicose por minuto) (21-22).

Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase): foi utilizada como substrato uma solução de carboximetilcelulose sódica a 2% em tampão citrato 0,05M, pH 4,8. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5mL do substrato e 0,5mL do extrato enzimático. A reação de hidrólise foi incubada a  $50^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. A glicose liberada foi estimada pela reação com ácido 3,5-dinitro salicílico. Uma unidade da atividade da endoglucanase equivale a  $1\mu\text{mol}$  de glicose liberada por minuto (21-22).

Determinação da atividade proteolítica: foi analisada utilizando como substrato a azocaseína. Dessa forma, misturou-se  $100\mu\text{L}$  do extrato do sobrenadante a  $100\mu\text{L}$  do tampão tris 0,1M, pH 9. Em seguida, foi adicionado  $100\mu\text{L}$  da azocaseína (10mg/mL). A mistura reacional foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se  $500\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação a  $10.000\text{g}$  por 5 minutos em centrífuga (MINISPIN - EPPENDORF), foi adicionado  $200\mu\text{L}$  de NaOH 1,8N ao sobrenadante. A leitura da amostra foi realizada no comprimento de onda igual a 420nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01 a 420nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O branco foi feito adicionando-se água destilada no lugar do sobrenadante (10).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização do resíduo do cajá

A caracterização do resíduo do cajá, coletado logo após o processamento da fruta, utilizado como substrato no processo de produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e proteolíticas, na fermentação em estado sólido, está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3:** Caracterização do bagaço do cajá.

Parâmetros Analisados	Unidade	Resultados
Sólidos solúveis	°brix	7,8
Densidade aparente	g/mL	0,2857
pH	-	2,64
Umidade	%	80,38
Cinzas	%	1,38
Açúcares redutores totais	mg/g	8,29

Fonte: Autor (2017).

O resíduo do cajá apresentou uma concentração de sólidos solúveis (7,8°brix) bem próxima à concentração encontrada na polpa (10,09°brix) (5), uma vez que foi utilizado *in natura*, não passando por nenhum tipo de tratamento. Também é caracterizado por possuir alta umidade, teor de açúcares redutores igual a 8,29mg de ART/g de amostra, e bastante ácido, sendo necessário corrigir o pH para o mais próximo da neutralidade (6,5 – 7,0) durante o preparo do meio de cultivo, porém a correção foi dificultada devido a característica heterogênea da biomassa, como granulometria não definida e a própria composição do substrato (fibras e cascas).

A densidade aparente (0,2857g/mL) mostra que os resíduos tendem a não se compactarem, o que propicia uma melhor aeração do meio de cultivo, devido à porosidade e os espaços vazios da matéria, permitindo um melhor desenvolvimento do micro-organismo.

### Fermentação em estado sólido

Durante o cultivo de 120 horas, as características do substrato sofreram algumas alterações visuais. O meio, antes de ser inoculado, apresentava uma coloração marrom devido ao processo de esterilização, mas no decorrer da fermentação, o cultivo foi

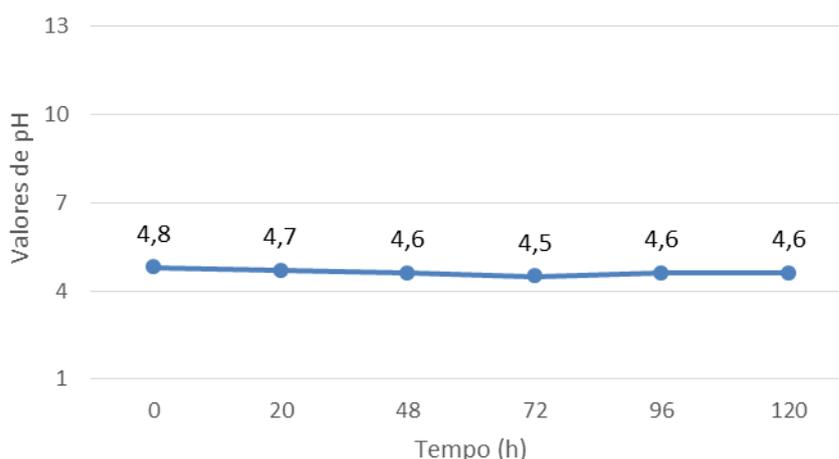


adquirindo uma cor um pouco mais clara, consequência do crescimento do *Bacillus* sp. na matriz sólida. O aroma do bagaço de cajá também foi alterado para o cheiro característico do processo fermentativo.

Ao comparar o cultivo, no início do processo e após 20 horas, observou-se o aumento da turbidez e viscosidade do extrato enzimático durante a filtração.

## pH

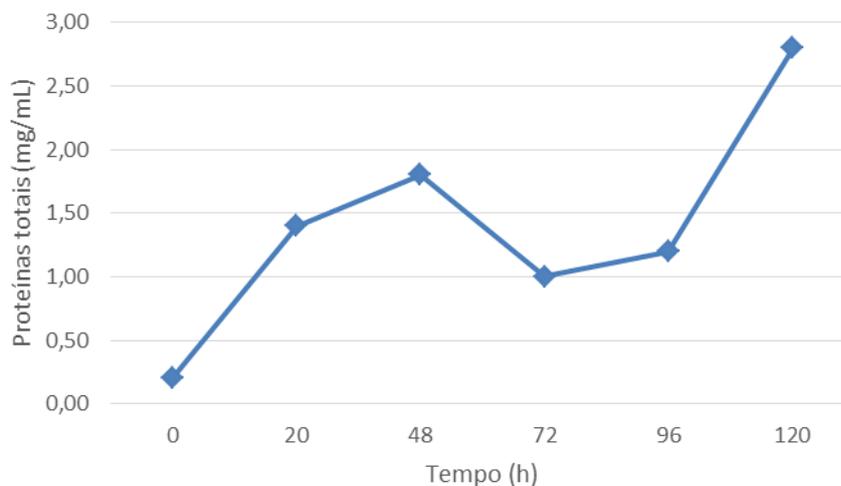
O pH apresentou-se constante durante o processo fermentativo, devido as características tamponantes dos reagentes adicionados ao meio nutriente e ao próprio tampão utilizado para arrastar as enzimas da matriz sólida (Figura 1).



**Figura 1:** Valores de pH no decorrer de 120 horas do cultivo.

## Proteínas totais

Durante o processo, a quantidade de proteínas totais se modificou, mostrando um perfil satisfatório no aumento da produção de proteína total, indicativo significativo da produção enzimática (Figura 2).

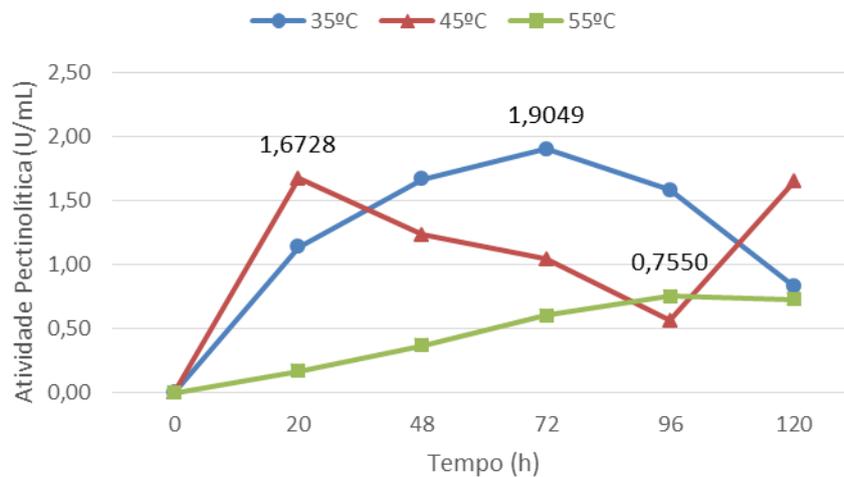


**Figura 2:** Quantidade das proteínas totais (mg/mL) no decorrer do processo fermentativo até 120 horas.

### **Atividade pectinolítica**

Para determinação do efeito da temperatura sobre a estabilidade da pectinase, o extrato enzimático bruto foi incubado durante 30 minutos nas temperaturas 35°, 45° e 55°C e a atividade pectinolítica verificada de acordo com a metodologia descrita na sessão anterior.

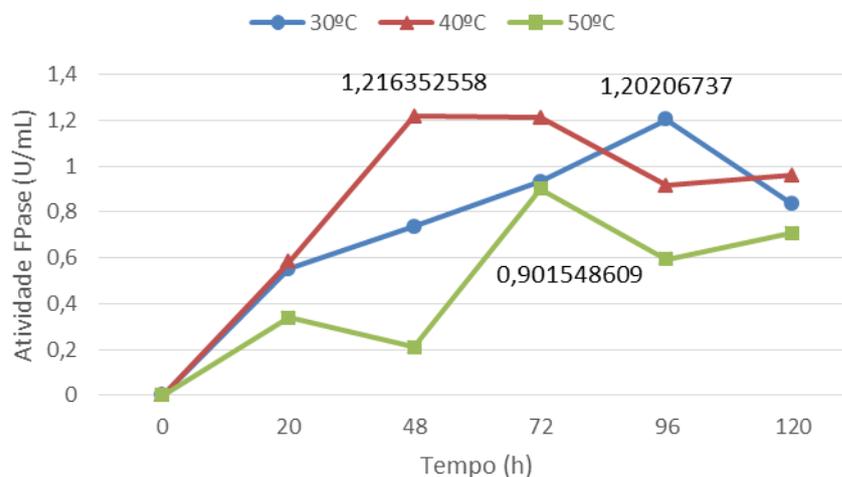
A incubação do extrato enzimático bruto a temperatura igual a 35°C, propiciou um aumento gradual da atividade da pectinase, atingindo a atividade máxima (1,90 U/mL) no tempo de 72 horas. Entretanto, quando houve um aumento da temperatura para 45°C, a atividade enzimática (1,67 U/mL) foi acentuada no tempo de cultivo de 20 horas, após isso houve um declínio até o tempo de 96 horas. A temperatura de incubação igual a 55°C permitiu o aumento da atividade durante o processo, porém a enzima atingiu menos da metade de sua atividade máxima (0,75 U/mL) (Figura 3). Com base nessa análise, pode-se inferir que o aumento da temperatura resulta na diminuição da atividade pectinolítica, por não ser uma enzima termoestável.



**Figura 3:** Estabilidade da atividade pectinolítica sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado durante 30 minutos sob as temperaturas de 35°, 45° e 55°C.

#### Atividade celulolítica total (FPase)

O extrato enzimático bruto foi incubado nas temperaturas de 30°, 40° e 50°C para posterior análise da atividade da FPase.



**Figura 4:** Estabilidade da atividade da FPase sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C.

Na própria temperatura de cultivo, 30°C, a atividade enzimática atingiu 1,2U/mL às 96 horas, porém essa mesma atividade foi atingida às 48h quando a temperatura de incubação foi aumentada para 40°C, o que implica dizer que a elevação da temperatura até 40°C

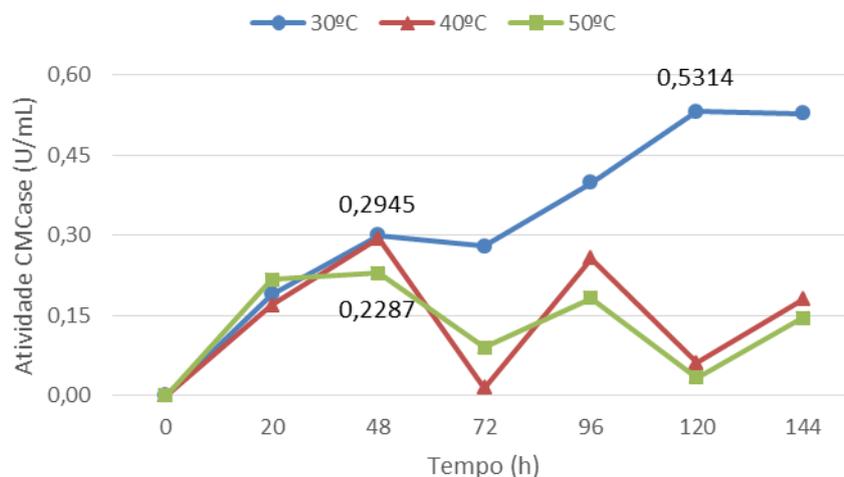


resultou em uma melhor atividade enzimática. Mas, em temperaturas extremas, como 50°C, a atividade enzimática diminuiu para 0,9U/mL devido provavelmente a inativação da enzima (Figura 4).

### Atividade da endoglucanase (CMCase)

O extrato enzimático bruto foi incubado nas temperaturas de 30°, 40° e 50°C para posterior análise da atividade da CMCase.

A atividade enzimática apresentou comportamentos semelhantes até 48 horas, nas temperaturas de 30° e 40°C. Porém, analisando até 120 horas, a melhor atividade apresentada foi na temperatura de incubação de 30°C. Quando a temperatura foi elevada para 40°C e 50°C, a partir das 72 horas e 48 horas, respectivamente, foi observado que a atividade enzimática demonstrou instabilidade, o que permite dizer que a CMCase produzida nesse processo não é uma enzima termoestável (Figura 5).



**Figura 5:** Estabilidade da atividade da CMCase sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C.

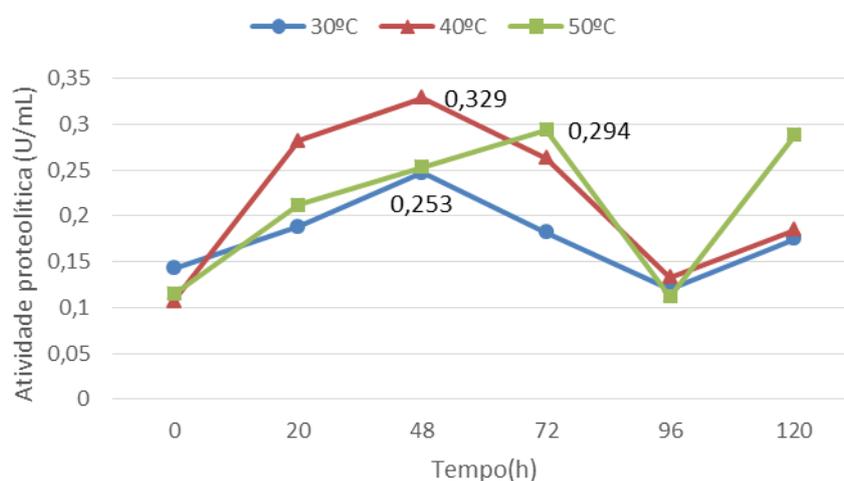
### Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi analisada para ser comparada com as atividades pectinolíticas e celulolíticas, uma vez que as proteases são produzidas normalmente pelo



*Bacillus* sp. e a sua produção está estritamente relacionada com o metabolismo do micro-organismo, sendo necessário quantificá-la.

Os resultados da atividade proteolítica demonstraram um comportamento semelhante quando comparada a atividade do extrato enzimático bruto incubado nas diferentes temperaturas (30°, 40° e 50°C), podendo inferir que as proteases produzidas durante o processo fermentativo possuem uma maior resistência ao calor. Entretanto, a melhor atividade enzimática foi observada na temperatura de incubação de 40°C, no tempo de 48 horas, sendo maior (78%) do que a melhor atividade enzimática obtida na temperatura de 30°C, implicando dizer que a melhor estabilidade enzimática se encontra a 40°C (Figura 6).



**Figura 6:** Estabilidade da atividade proteolítica sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C.

### Quantificação específica das enzimas

As pectinases apresentaram a maior atividade enzimática sobre as proteínas totais (1,905U/mL) na temperatura de incubação de 35°C, havendo uma redução desse valor à medida que houve o aumento da temperatura (Tabela 4).

As FPases apresentaram uma maior atividade enzimática sobre as proteínas totais do que as CMCases na incubação do extrato enzimático bruto nas três temperaturas.

Já as proteases apresentaram um comportamento diferente, a atividade enzimática sobre as proteínas totais aumentaram ao passo que houve o aumento da temperatura de incubação. Porém sua produção foi baixa, uma vez que o metabolismo microbiano estava



voltado para produção de pectinases e celulases, em especial as FPases, devido ao substrato ofertado no processo fermentativo.

**Tabela 4:** Quantificação específica das enzimas produzidas durante o processo.

Enzimas produzidas na FES	Enzima produzida/ proteínas totais (U/mg)		
	30°/35°C	40°/45°C	50°/55°C
Pectinases	1,905	1,195	0,629
FPases	1,002	0,676	0,901
CMCases	0,189	0,164	0,127
Proteases	0,140	0,182	0,294

Fonte: Autor (2017).

## CONCLUSÃO

A utilização do resíduo do cajá *in natura* no processo de fermentação em estado sólido pelo *Bacillus* sp. se demonstrou favorável à produção das enzimas pectinolíticas e celulolíticas.

As pectinases produzidas no processo fermentativo não são termoestáveis, apresentaram atividade ótima a 35°C e com aumento da temperatura houve redução da atividade enzimática. As pectinases foram as enzimas mais produzidas durante o processo.

As FPases apresentaram melhor atividade enzimática a 40°C e foram as segundas mais produzidas.

Já as CMCases demonstraram atividade ótima a 30°C, porém o aumento da temperatura de incubação do extrato enzimático bruto afetou significativamente a estabilidade enzimática e não foram muito produzidas durante o processo.

As proteases apresentaram termoestabilidade com o aumento da temperatura, porém sua produção foi baixa.

## REFERÊNCIAS

1. Pandey A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 13, (2): 81-84.
2. Uenojo M, Pastore GM. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*. 2007; 30 (2), 388-394.
3. Soccol CR, Vandenbergher LPS. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 13: 205- 218.
4. Souza FX, Lima RN. Enraizamento de estacas de diferentes matrizes de cajazeira tratadas com ácido indolbutírico. *Revista Ciência Agronômica*. 2005; 36 (2): 189-194.



5. Mattietto RA, Lopes AS, Menezes HC. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. Brazilian Journal of food technology. 2010; 13 (3): 156-164.
6. Monteiro VN, Silva RN. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos. 2009; 3 (5): 9-23.
7. Mukesh Kumar DJ, Saranya GM, Suresh K, Andal Priyadharshini D, Rajakumar R, Kalaichelvan PT. Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. Asian Journal of Plant Science and Research. 2012; 2: 369-375.
8. Vijayaraghavan P, Arun A, Al-Dhabi NA, Vicent SGP, Arasu MV, Choi KC. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulose and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation. Biotechnology for Biofuels. 2016; 9 (73): 1-13.
9. Sharma A, Tewari R, Rana SS, Soni R, Soni SK. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. Appl Biochem Biotechnol, 2016.
10. Giongo JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. [Tese]. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
11. Santi L, Berger M, Silva WOB. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. Caderno pedagógico. 2014; 11 (1): 130-139.
12. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ªed. São Paulo, 1985.
13. Correia RTP. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. [Tese]. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2004.
14. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ªed. São Paulo, 2005.
15. Moraes JPS, Rosa MF, Marconcini JM. Procedimentos para análises lignocelulósicas. 1ªed. Campina Grande: Embrapa Algodão; 2010.
16. Santos SFM. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. [Tese]. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.
17. Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. Process Biochemistry. 2007; 42 (8): 1191-1199.
18. Monteiro VN, Silva RN. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos. 2009; 3 (5): 9-23.
19. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72 (1/2): 248-254.
20. Pinheiro ER. Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*): Otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. [Tese] Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
21. Oliveira Júnior SD. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. [Tese] Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2014.
22. Alva S, Anupama J, Salva J, Chiu YY, Vyshali P, Shruti M, et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6 (5): 576-581.