

CARACTERIZAÇÃO DE POLIGALACTURONASE DE *Nigrospora gorlenkoana* UTILIZANDO CASCA DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) COMO SUBSTRATO FERMENTATIVO

Andreza Lima Santos¹, Catiule de oliveira Santos², Gildomar Lima Valasques Júnior³

¹Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié-BA, Bolsista FAPESB.

²Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, UESB, Jequié-Ba

³Professor Doutor, Departamento de Ciências Tecnológicas, UESB, Jequié-BA.

RESUMO

O estudo investigou a produção e caracterização da poligalacturonase (PG) pelo fungo *Nigrospora gorlenkoana*, utilizando casca de cacau como substrato em fermentação em estado sólido. A pesquisa buscou alternativas sustentáveis para aproveitamento de resíduos agroindustriais e produção de biocatalisadores de interesse industrial. Os resultados mostraram que a enzima apresentou maior atividade em pH 5 e 50 °C, com boa estabilidade em diferentes faixas de pH, termoestabilidade em temperaturas moderadas e parâmetros cinéticos que indicam afinidade pelo substrato ($K_m = 2,75$ mg/mL; $V_{max} = 2,35$ μ mol/min). Entre os sais testados, o KCl foi o mais eficaz na preservação da atividade, enquanto o $CaCl_2$ exerceu efeito inibitório acentuado. Essas características reforçam o potencial biotecnológico da PG para aplicação em setores como alimentício (clarificação de sucos), têxtil e farmacêutico, especialmente em processos que demandam condições levemente ácidas e temperaturas intermediárias. O uso da casca de cacau demonstrou-se eficiente, agregando valor a um resíduo agrícola e contribuindo para práticas de economia circular.

PALAVRAS-CHAVE: Casca de cacau, *Nigrospora gorlenkoana*, Fermentação em estado sólido, Poligalacturonase.

ABSTRACT

The study investigated the production and characterization of polygalacturonase (PG) by the fungus *Nigrospora gorlenkoana*, using cocoa husk as a substrate in solid-state fermentation. The research aimed to explore sustainable alternatives for the utilization of agro-industrial residues and the production of biocatalysts of industrial relevance. The results showed that the enzyme exhibited optimal activity at pH 5 and 50 °C, with good stability across a range of pH values, moderate thermal stability, and kinetic parameters indicative of substrate affinity ($K_m = 2.75$ mg/mL; $V_{max} = 2.35$ μ mol/min). Among the salts tested, KCl was the most effective in preserving enzymatic activity, while $CaCl_2$ had a markedly inhibitory effect. These characteristics highlight the biotechnological potential of PG for applications in sectors such as food (juice clarification), textile, and pharmaceutical industries, particularly in processes requiring mildly acidic conditions and intermediate temperatures. The use of cocoa husk proved to be efficient, adding value to an agricultural residue and contributing to circular economy practices.

KEYWORDS: Cocoa husk, *Nigrospora gorlenkoana*, Solid-state fermentation, Polygalacturonase.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por biocatalisadores sustentáveis tem impulsionado a busca por enzimas microbianas obtidas a partir de resíduos agroindustriais. Entre essas enzimas, as poligalacturonases (PGs) destacam-se por catalisar a degradação de pectinas, polímeros abundantes na parede celular de vegetais. Tais enzimas exercem papel central na indústria alimentícia, principalmente na clarificação de sucos, e apresentam ainda aplicabilidade nos setores têxtil e farmacêutico, em que processos de hidrólise controlada são desejáveis (GUIMARÃES et al., 2022; PATEL; KUNJADIA; PARMAR, 2023).

O gênero *Nigrospora* reúne fungos filamentosos reconhecidos pela capacidade de secretar enzimas hidrolíticas de interesse industrial. Entre suas espécies, *Nigrospora gorlenkoana* destaca-se como potencial produtora de PGs em condições de fermentação em estado sólido (FES), técnica vantajosa por simular o ambiente natural de crescimento dos fungos, apresentar baixo custo e possibilitar o uso de substratos lignocelulósicos de fácil obtenção (BHADRA et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2024).

A casca de cacau (*Theobroma cacao* L.), resíduo abundante da agroindústria cacaujeira, apresenta elevado teor de carboidratos e pectina, configurando-se como substrato promissor para a produção enzimática. O aproveitamento desse material agrega valor a um subproduto frequentemente descartado de forma inadequada, além de contribuir para práticas de economia circular e para a redução de impactos ambientais (ANORAGA et al., 2024).

Nesse contexto, a caracterização da poligalacturonase de *N. gorlenkoana* obtida em FES com casca de cacau mostra-se relevante, fornecendo informações sobre suas propriedades bioquímicas e evidenciando seu potencial de aplicação em processos industriais sustentáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo *Nigrospora gorlenkoana* foi obtido da Micoteca da Universidade do Estado da Bahia e cultivado em BDA a 30 °C por 5 dias (AGARWAL; KULHARA; BISEN, 1977). A casca de cacau (*Theobroma cacao* L.) higienizada e esterilizada foi utilizada como substrato em fermentação em estado sólido, conduzida em Erlenmeyers com 30 g do resíduo suplementado com peptona (3%) e inoculado com 10⁶ esporos/mL,

incubado a 30 °C por 7 dias, empregando-se o planejamento Doehlert para otimização (BEZERRA et al., 2008).

O extrato enzimático foi obtido por agitação em tampão acetato pH 5,5, centrifugação, precipitação com sulfato de amônio e diálise (ORTIZ et al., 2012). A atividade foi determinada com ácido poligalacturônico como substrato e açúcares redutores medidos pelo método DNS (MILLER, 1959).

A caracterização incluiu determinação de pH e temperatura ótimos, estabilidade frente a variações de pH (CUI et al., 2021) e temperatura, além da estimativa de K_m e V_{max} por curvas de Michaelis-Menten e da influência de cátions metálicos (SANTOS et al., 2024). Os experimentos foram conduzidos em triplicata, com análise estatística pelo teste t de Student ($p < 0,05$) utilizando Statistica 10.0 e Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento Doehlert permitiu avaliar os efeitos do pH e da temperatura na produção de poligalacturonase por *Nigrospora sphaerica*. A atividade enzimática variou entre 0,217 e 0,533 $\mu\text{mol}/\text{min}$, sendo a maior resposta observada a 50 °C e pH 5, com média de 0,537 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Figura 1). Essa condição representou o ponto ótimo, enquanto valores extremos de acidez ou alcalinidade resultaram em menor atividade, comportamento semelhante ao descrito para outras poligalacturonases fúngicas (CUI et al., 2021).

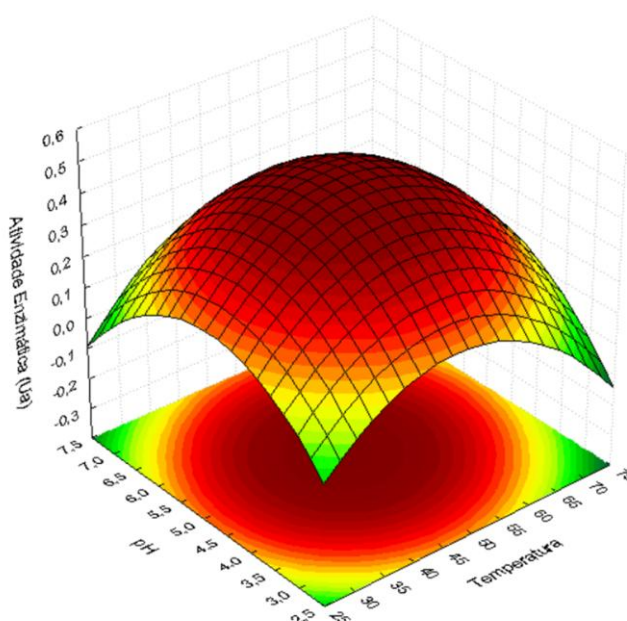


Figura 1. Superfície de resposta mostrando a influência do pH e da temperatura na atividade da poligalacturonase produzida por *Nigrospora gorlenkoana*

A análise de variância (ANOVA) indicou que o modelo quadrático não foi significativo (F calculado = 6,49 < F tabelado = 9,01). No entanto, a falta de ajuste não se mostrou significativa ($F = 0,22 < 18,51$), o que valida a adequação do modelo dentro da faixa experimental avaliada.

A poligalacturonase de *N. gorlenkoana* apresentou elevada estabilidade frente ao pH, preservando mais de 97% da atividade residual entre pH 3 e 7, com melhor desempenho em pH 5 (99%). A análise cinética, ajustada pelo modelo de Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,9889$), revelou valores de K_m de 2,75 mg/mL e V_{max} de 2,35 $\mu\text{mol}/\text{min}$, indicando afinidade pelo substrato e eficiência catalítica comparável às de outras poligalacturonases relatadas na literatura (LIU et al., 2023).

Quanto à termoestabilidade, a enzima manteve aproximadamente 83% da atividade após 50 minutos a 50 °C, mas apresentou perdas em temperaturas mais elevadas. A 70 °C e 80 °C, a atividade residual reduziu-se para cerca de 32% e 38%, respectivamente, evidenciando desnaturação sob condições extremas. Esses resultados reforçam que a enzima apresenta perfil típico de poligalacturonases fúngicas, com estabilidade em faixa de pH (4 a 6) e parâmetros cinéticos promissores para aplicações biotecnológicas, especialmente em processos que demandam condições levemente ácidas e temperaturas intermediárias (SANTOS et al., 2024).

A influência de sais mostrou que o KCl foi o mais eficaz na preservação da atividade enzimática, enquanto o CaCl_2 apresentou efeito inibitório marcante. O NaCl causou redução moderada, e FeCl_2 e NH_4Cl mantiveram estabilidade intermediária. Esses resultados indicam que íons monovalentes, sobretudo o K^+ , favorecem a estabilidade da poligalacturonase, ao passo que cátions divalentes tendem a comprometer sua conformação ativa.

CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

O presente trabalho confirma a viabilidade da produção de enzimas hidrolíticas de interesse industrial por fungos do gênero *Nigrospora* cultivados em resíduos agroindustriais. A casca de cacau mostrou-se um substrato eficiente para a produção de poligalacturonase por *Nigrospora sphaerica*. A enzima apresentou maior atividade em pH 5 e 50 °C, além de estabilidade em diferentes faixas de pH, termoestabilidade a temperaturas moderadas e parâmetros cinéticos que indicam boa afinidade pelo substrato. Esses achados reforçam o potencial biotecnológico da poligalacturonase,

especialmente para processos que demandam condições levemente ácidas e temperaturas intermediárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, G. P.; KULHARA, D.; BISEN, P. S. In vitro production of pectolytic enzymes by *Pleospora infectoria* and *Nigrospora sphaerica*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, v. 171, n. 1, p. 7-16, 1977.
2. ANORAGA, S. B. et al. Cocoa by-products: A comprehensive review on potential uses and green technologies. *Heliyon*, v. 10, n. 16, e35537, 2024.
3. BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, p. 965-977, 2008.
4. BHADRA, F. et al. Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. *3 Biotech*, v. 12, n. 4, p. 86, 2022.
5. CUI, Z. et al. Biochemical properties of alkaline pectinases from thermophilic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 181, p. 1126-1135, 2021.
6. GUIMARÃES, F. C. et al. Enzymatic treatment for juice clarification: advances and challenges. *Food Chemistry Advances*, v. 2, p. 100045, 2022.
7. LIU, S. et al. Recent advances in polygalacturonase: industrial applications and challenges. *Carbohydrate Research*, v. 528, p. 108816, 2023.
8. MESBAH NM. Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022
9. MILLER, G. L. Uso do reagente ácido dinitrossalicílico para determinação de açúcares redutores. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
10. OLIVEIRA, T. S. M. et al. Production of polygalacturonase by *Aspergillus brasiliensis* using agro-industrial residues. *Food Bioscience*, v. 53, p. 102818, 2024.
11. ORTIZ, G. E. et al. Purification and characterization of a polygalacturonase from *Aspergillus niger* for industrial applications. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 6, p. 893-899, 2012.
12. PATEL, A.; KUNJADIA, P.; PARMAR, K. Application of fungal pectinases in juice clarification. *3 Biotech*, v. 13, p. 141, 2023.
13. SANTOS, E. G. et al. Production, characterization and application of polygalacturonase by *Lentinus tigrinus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 58, p. 103216, 2024.