



## Farinha do caroço de abacate como substrato alternativo para produção de pectinases por *Gongronella butleri*

Héberly Fernandes Braga<sup>a\*</sup>, Milla Alves Baffi<sup>b</sup>, Heloiza Ferreira Alves do Prado<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

<sup>c</sup> Universidade Estadual Paulista, Brasil

\* Autor correspondente ([heberly@iftm.edu.br](mailto:heberly@iftm.edu.br))

### INFO

#### Keywords

enzymatic bioproduction  
bioprocesses  
solid state cultivation

### ABSTRACT

#### *Avocado seed meal as an alternative substrate for pectinase production by *Gongronella butleri**

The use of leftovers or refuse from agricultural and/or agro-industrial production for the cultivation of microorganisms with enzyme production has become constant, as well as being suitable as a sustainable alternative; adds value to by-products; and also acts as a mitigation strategy for environmental changes. The present work aimed to study the profile of the bioconversion activity of avocado kernel flour, carried out by the fungal strain *Gongronella butleri*, in order to produce pectinases. The fungal strain was inoculated in triplicate, in flasks containing freeze-dried avocado seed meal, which were previously moistened with nutrient saline solution and sterilized. Fermentations took place at 35°C for 24, 48, 72, 96 and 120 h. The production profile of pectinases over time was determined by measuring the enzymatic activity ( $U\ g^{-1}$ ) of the crude extract obtained in the fermentations, using spectrophotometry at 540 nm, according to the standard method of reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The avocado kernel flour induced the production of enzymes, with an increase in pectinolytic activity with the course of fermentation, reaching the peak of highest activity ( $19.43\ U\ g^{-1}$ ) at 96 h. In comparison with studies that used microbial genera considered standard for the fermentation of agro-industrial "waste" and the production of pectinases, the fungal strain of *G. butleri*, presents itself as a potential alternative biological agent in the production of pectinases, when compared to stone flour from avocado, especially if optimization tests are applied.

### RESUMO

O emprego das sobras ou refugos da produção agrícola e/ou agroindustrial, para o cultivo de microorganismos com produção de enzimas tem se tornado constante, pois além de adequar-se como uma alternativa sustentável; agrega valor aos subprodutos; e ainda atua como uma estratégia de mitigação das alterações ambientais. O presente trabalho objetivou estudar o perfil da atividade de bioconversão da farinha do caroço de abacate, realizada pela cepa fúngica *Gongronella butleri*, visando-se produzir pectinases. A cepa fúngica foi inoculada em triplicata, em frascos contendo farinha de caroço de abacate liofilizada, sendo estes previamente umidificados com solução salina nutriente e esterilizados. As fermentações ocorreram a 35°C por 24, 48, 72, 96 e 120 h. O perfil de produção de pectinases ao longo do tempo foi determinado pela mensuração da atividade enzimática ( $U\ g^{-1}$ ) do extrato bruto obtido nas fermentações, por meio de espectrofotometria a 540 nm, conforme método padrão de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS). A farinha do caroço de abacate induziu a produção de enzimas, sendo observado aumento da atividade pectinolítica com o decorrer do tempo de fermentação, atingindo-se o pico de maior atividade ( $19,43\ U\ g^{-1}$ ) a 96 h. Em comparação com estudos que empregaram gêneros microbianos considerados padrão para fermentação de "resíduos" agroindustriais e produção de pectinases, a cepa fúngica de *G. butleri*, apresenta-se como potencial agente biológico alternativo na produção de pectinases, quando frente a farinha do caroço de abacate, especialmente se testes de otimização forem aplicados.

Received 12 January 2023; Received in revised from 19 March 2023; Accepted 20 March 2023



## INTRODUÇÃO

A busca por alternativas sustentáveis tem mobilizado diferentes atividades, processos e setores sociais, sejam eles públicos ou privados, visando-se racionalizar a produção, as metodologias e os serviços de forma mais viável, justa e correta em termos econômicos, sociais e ambientais (Silva e Megale, 2020).

O setor agropecuário e agroindustrial, baseado em especial na produção de alimentos, ainda atua como um dos mais importantes pilares de sustentação da economia brasileira (Moreira, 2016), entretanto pode causar prejuízos ambientais em diferentes vertentes, caso os manejos adequados não sejam realizados. Entre os possíveis problemas, destaca-se a grande quantidade de “resíduos” de biomassa gerados ao longo das cadeias agroindustriais (Deliberador et al., 2018).

Segundo Veronezi e Jorge (2012), o Brasil beneficia e processa uma enorme quantidade de vegetais, como os frutos, por exemplo, para se elaborar sucos, néctares, doces, extratos, polpas, e outros, todavia quase 60% do peso desses vegetais são constituídos por cascas, folhas e caroços, agregando-se como sobras e refugos do processo produtivo. Esses materiais orgânicos rejeitados, podem ser aproveitados como coprodutos e empregados na elaboração de alimentos para humanos e animais; transformados em fertilizantes e adubos para plantas; convertidos em calor por meio de queima em fornalhas; e como fonte direta ou indireta na produção de biocombustíveis (Silva et al., 2019; Souza et al., 2019).

Outra frente de estudos que vem buscando alternativas de aproveitamento desses subprodutos agroindustriais é empregá-los como substrato no cultivo de micro-organismos, especialmente fungos, estimulando a bioprodução de enzimas de interesse comercial. Isso porque, além desses componentes orgânicos ainda apresentarem energia potencial metabolizável e nutrientes, que podem ser convertidos biologicamente (Panda et al., 2016); é possível otimizar a produção enzimática devido à versatilidade bioquímico-metabólica dos micro-organismos (Abdullah et al., 2018); bem como têm-se notado o crescimento do mercado mundial de catalizadores biológicos, com projeções de rentabilidade global de 7,48 bilhões de dólares para 2025 (BCC Research, 2018).

Dentre as distintas formas tecnológicas de obtenção de enzimas microbianas, como as pectinases, destaca-se o cultivo de micro-organismos em es-

tado sólido (CES) com emprego de fungos filamentosos, pois conforme Santos et al. (2018) essa técnica é economicamente menos onerosa e de mais fácil realização, apresentando menor susceptibilidade à inibição e estabilidade enzimática, além de um maior rendimento, haja visto que o processo permite recuperar mais facilmente as enzimas dispersas no extrato fermentado.

As pectinases são usadas em diferentes setores e atividades industriais, desde a retirada da goma de fibras vegetais, simplificando seu condicionamento industrial; até a clarificação e diminuição da viscosidade de bebidas no setor alimentício; como também na facilitação da extração de óleos essenciais e na produção de biocombustíveis e outros produtos (Amin et al., 2019).

Considerando que o farelo de trigo tem sido ainda um dos substratos mais empregados para o cultivo de micro-organismos (em particular de *Aspergillus niger*) e produção de enzimas (Santos et al., 2018), objetivou-se estudar o perfil da atividade de *Gongronella butleri* na bioconversão da farinha do caroço de abacate como substrato alternativo em CES, visando produzir pectinases.

## MATERIAL E MÉTODOS

Frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 5 g de farinha ( $\leq 0,5$  mm) do caroço de abacate liofilizada (lote: Gene - 8963, Jardim de Minas) foram umedecidos com 10 mL de solução salina (0,26%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,22%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03%  $\text{CaCl}_2$ ), sendo esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em seguida foram inoculados assepticamente em cada frasco, cinco discos (5 mm cada) contendo micélio do fungo *G. butleri*, isolado do solo do Cerrado (Mato Grosso do Sul, Brasil), e previamente cultivado em ágar Batata Dextrose comercial a 35°C  $\pm 0,5$ , por 72 horas.

A fermentação foi realizada em 24, 48, 72, 96 e 120 h, em incubadora Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) sem agitação a 35°C  $\pm 0,5$ . Para cada cultivo/tempo de fermentação foram feitos testes em triplicata e os resultados obtidos expressos pela média das replicatas. Ao final de cada período de fermentação foram adicionados assepticamente aos frascos 50 mL de água destilada estéril, e esses agitados (100 ciclos  $\text{min}^{-1}$ ) em shaker a 25°C  $\pm 0,5$ , por 1 h. O fermentado foi filtrado em gaze estéril e centrifugado a 10.000 g, por 10 min., sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática.

Empregou-se colorimetria usando o método de determinação de açúcares redutores pelo ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), para se

estimar a atividade pectinolítica, sendo a absorbância (abs.) mensurada em espectrofotômetro a 540 nm, segundo comparação a uma de curva calibração padronizada do DNS (Equação 1:  $y = 0,2041x - 0,0285$ ;  $R^2 = 0,9901$ ), utilizando-se diluições de ácido galacturônico a 0,1% (Figura 1). Os resultados foram expressos

em Unidades Internacionais por grama de substrato ( $U\ g^{-1}$ ), que corresponde à quantidade de enzima necessária para liberar  $1\ \mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto de reação. A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme Equação 2.

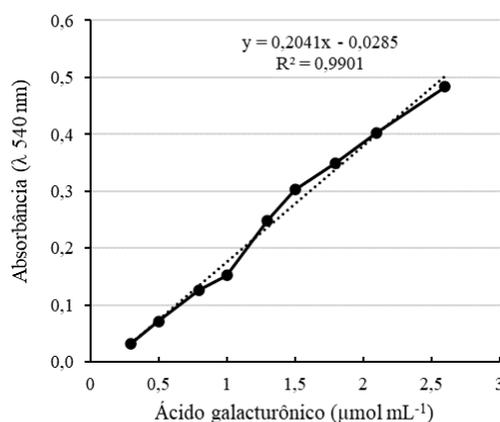


Figura 1 - Curva de calibração da padronização da solução do ácido ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Determinação enzimática (Equação 2):

$$U\ g^{-1} = \left\{ \left[ \frac{\text{solução da equação 1}}{(0,05 * 10)} \right] * fd \right\} * A \quad (2)$$

Onde:

$U\ g^{-1}$  = quantidade de enzima necessária para liberar  $1\ \mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto de reação;

$y$  = (abs. do meio reacional – abs. do controle);

0,05 = volume de solução enzimática bruta;

10 = tempo da reação em minutos;

fd = fator de diluição da solução enzimática bruta;

A = fator de diluição correspondente ao volume de água adicionado ao sistema após fermentação

(nesse caso, 10 vezes).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo dos tempos de fermentação foi notado um aumento da atividade enzimática, atingindo-se no período de 96 h, o maior pico de produção de pectinases ( $19,43\ U\ g^{-1}$ ) (Figura 2). Resultado similar foi obtido por Braga et al. (2019), empregando-se a mesma cepa fúngica para se converter palha de milho verde lavada, seca e tritura. Nesse caso, os autores obtiveram  $20,1\ U\ g^{-1}$ .

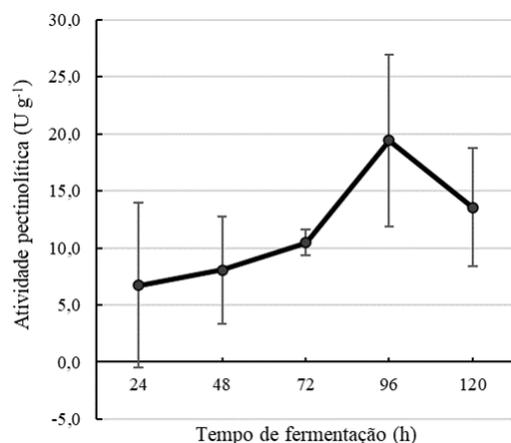


Figura 2 - Perfil de produção de pectinases por *Gongronella butleri*, frente a farinha da do caroço de abacate, empregando-se cultivo em estado sólido a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ .

Em testes realizados com biorreator de leite empacotado em escala piloto usando farelo de trigo, Pitol et al. (2016), obtiveram atividades enzimáticas entre 11 a 28 U g<sup>-1</sup> em diferentes regiões do leite, durante 26 h, com temperaturas atingindo 47°C, ao se empregar *A. niger*. A média dos valores de atividade enzimática encontrados por esses autores está muito próxima a dos resultados obtidos no presente estudo. Rocha (2010) empregando testes otimizados que combinaram resíduo de arroz (farelo e casca) com casca de maracujá, obtiveram atividade pectinásica máxima de 9,0 U g<sup>-1</sup>, num período de 288 h (12 dias) a 35°C, ao usar cepa padrão *A. niger* ATCC 16404. Conforme observado na Figura 02, tal atividade média foi atingida no presente estudo em menor período de tempo (entre 48 e 72 h).

Conforme estudo de determinação centesimal e mineral realizada por Nascimento et al. (2016), a farinha do caroço de abacate é rica em proteínas, fibras e minerais, apresentando alta concentração de potássio (11,27%), ferro (20,26%), zinco (11,56%), cobre (5,90%) e manganês (3,14%), além de quantidades menores de enxofre (1,80%), cálcio (1,21%), fósforo (1,20%) e magnésio (1,17%). Dentre esses minerais, alguns são necessários ao metabolismo e desenvolvimento microbiano, demonstrando ser a farinha um bom substrato para emprego em processos fermentativos.

Considerando ao alto percentual de carboidratos disponíveis na farinha do caroço de abacate (63,8%) (Nascimento et al., 2016) acredita-se que o pico de atividade pectinolítica possa ser atingido em menores tempos de fermentação, caso esse substrato passe por um processo prévio de tratamento, como a lavagem, por exemplo. Isso por que a disponibilidade de açúcares fermentescíveis no meio, promove a inibição catabólica inicial da pectina, haja visto que tais açúcares estão prontamente disponíveis para serem metabolizados e aproveitados pelo micro-organismo.

É importante ressaltar que o pico de atividade enzimática aqui encontrada encaixa-se dentro da faixa de tempo de produção industrial corrente, entre 24 a 96 h (Coelho et al., 2001). Isso evidencia a potencialidade do agente biológico *G. butleri*, estudado na presente pesquisa, em produzir pectinases quando frente a farinha do caroço de abacate, especialmente se estudos mais detalhados de otimização e indução pectinolíticas forem adotados.

## CONCLUSÕES

A cepa fúngica isolada do solo do Cerrado

apresentou-se como potencial agente biológico alternativo na produção de pectinases, quando frente a farinha do caroço de abacate, exibindo atividade enzimática próxima a outros gêneros microbianos empregados como padrão no cultivo em estado sólido sobre “resíduos” agroindustriais, e dentro de um período de tempo considerado aplicável pra fins de ampliação do processo em escala industrial.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM), e ao Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC/ICIAG/UFU).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah R, Jafer A, Nisar K, Kaleen A, Iqtedar M, Iftikhar T et al Saleen F, Naz S. Process optimization for pectinase production by locally isolated fungal strain using submerged fermentation. Bioscience Journal, v.33, n.4, p.1025-1032, 2018. <https://doi.org/10.14393/Bj-v34n1a2018-39947>
- Amin F, Bhatti HN, Bilal M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases - A review. International Journal of Biological Macromolecules, v.122, p.1017-1026, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
- BCC Research: Market Research Reports & Industry Analysis. (2018). Global Industrial Enzymes Market. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/partners/verified-market-research/global-industrial-enzymes-market.html>. Acessado em Outubro, 2022.
- Braga HF, Alves-Prado HF, Baffi MA. Perfil de produção de pectinases por fungo isolado do solo do Cerrado, frente ao coproduto palha de milho, empregando cultivo em estado sólido. In: Simpósio de Biociências e Microbiologia. São José do Rio Preto, UNESP/IBILCE, p.68-70. 2019.
- Coelho MAZ, Leite SGF, Rosa MF, Furtado AAL. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.19, n.1, p.33-42, 2001. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v19i1.1220>
- Deliberador LR, Batalha, MO, Freire CD, Fontenelle AM, Sabadini FC. Perdas e desperdícios de alimentos ao longo da cadeia de suprimentos: uma análise de regiões desenvolvidas e em desenvolvimento. South American Development Society Journal, v.4, n.01, p.11-27, 2018. <http://dx.doi.org/10.24325/issn.2446-5763.vespi1p11-27>
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Moreira AM. Bioeconomia: plataforma mundial de inovação e sustentabilidade nas cadeias agroindustriais. *Revista Processos Químicos*, v.10, n.20, p.351-353, 2016.  
<https://doi.org/10.19142/rpq.v10i20.384>
- Nascimento MRF, Souza VF, Marinho AF, Ascheri JLR, Meleiro CHA. Composição centesimal e minerais de farinha de caroço de abacate (*Persea gratissima*, Gaertner f.). In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Gramado, SBCTA. p. 25. 2016.
- Panda, SK, Mishra SS, Kayitesi E, Ray RC. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: biotechnology and scopes. *Environmental Research*, v.146, p.161-172, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.035>
- Pitol LO, Biz A, Mallmann E, Krieger N, Mitchell DA. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, v.283, p.1009-1018, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.046>
- Rocha CP. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Santos PS, Solidade LS, Souza JGB, Lima GS, Braga Jr ACR, Assis FGV et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v.4, n.2, p.0181-0188, 2018.  
<https://doi.org/10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188>
- Silva FM, Pedroza MM, Oliveira LRA, Colen AGN, Amaral PHB. Rotas tecnológicas empregadas no aproveitamento de resíduos da indústria da soja. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.8, n.1, p.326-363, 2019.  
<http://dx.doi.org/10.5380/rber.v8i1.57694>
- Silva GF, Megale MHDS. O direito ao futuro como mandamento ético: a sustentabilidade e o modelo de produção alimentar no Brasil. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, v.9, n.II, p.811-822, 2020.  
<http://dx.doi.org/10.19177/rgsa.v9e02020811-822>
- Souza EFFS, Souza EFS, Silva LDB, Resende CGF, Nascen-tes AL. Avaliação da capacidade adsorptiva do sabugo de milho triturado. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v.2, n.4, p.1174-1190, 2019.
- Veronezi CM, Jorge N. Aproveitamento de sementes de abóbora (*Curcubita* sp.) como fonte alimentar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.14, n.1, p.113-124, 2012.  
<http://dx.doi.org/10.15871/1517-595/rbpa.v14n1p113-124>