

Área: Engenharia de Alimentos

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Aspergillus niger* ATCC 9642

Jonaina Gomes, Éllin Ambrozini, Eunice Valduga, Geciane Toniazzo, Jamile Zeni*

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim

*E-mail: jamilenzi@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos das condições de cultivo na produção de pectinases (pectato liase, pectinesterase, pectinametilesterase e pectina liase) pelo micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642. Para avaliar os efeitos das condições do meio de cultivo empregou-se metodologia de planejamento de experimentos. A máxima atividade de Pectina Liase (17,10 U/mL) foi obtida em 48 horas e da pectinametilesterase (17100 U/mL) foi obtida em 72 horas no meio de cultivo composto por 22 g/L de pectina, 20 g/L de extrato de levedura, 0,02 g/L de sulfato de ferro e 1,0 g/L de sulfato de magnésio, a 180 rpm, 30°C e pH inicial de 5,5. No entanto, as enzimas pectato liase e pectinesterase apresentaram valores muito baixos, sendo que a máxima atividade foi de 0,429 e 0,346 U/mL, respectivamente.

Palavras-chave: Pectinases, *Aspergillus niger* ATCC 9642, fermentação submersa, planejamento de experimentos.

1 INTRODUÇÃO

Pectinases são um grupo de enzimas que degradam a pectina por diferentes modo de ação, sendo as desesterificantes (pectinesterase), as despolimerizantes (hidrolases e liases) e as protopectinases. Sua classificação ainda pode ser baseada na preferência pelo substrato, como o ácido péctico ou pectato, que são os ácidos poligalacturônicos que não apresentam metoxilação e o ácido pectínico ou pectina, que são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos (Alkorta et al., 1997). Pectinases são enzimas que podem ser obtidas de plantas superiores e micro-organismos, sendo que o genero

Aspergillus, especialmente linhagens de *A. niger* são consideradas promissoras na produção das enzimas pécnicas (Dartora et al., 2002).

As pectinases possuem inúmeras aplicações na indústria de alimentos tais como a redução da viscosidade da polpa de fruta, (melhorando por sua vez, a extração, a filtração e a clarificação de sucos), acelerando e inibindo a formação de espuma nas fermentações de chá e café, auxiliando na extração de óleo vegetal, mantendo a textura de pedaços de frutas para posterior adição em outros produtos (Resende et al., 2004).

O conhecimento do perfil enzimático, ou seja, do conjunto de enzimas que um micro-organismo produz em determinado substrato, permite avaliar as potencialidades do preparado enzimático obtido. Dessa forma, torna-se importante o estudo da produção de pectinases pelo micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642, em função destas enzimas apresentarem uma vasta gama de aplicações.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Micro-organismo

A cepa do fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi cultivada em PDA durante 7 dias a 30°C. A concentração de esporos foi fixada em 5×10^6 esporos/mL. A quantidade de esporos na concentração fixa de 5×10^6 esporos/mL a ser adicionada nos meios de bioprodução era de 1% (1mL da suspensão de esporos para 100 mL de meio).

2.1.2 Bioprodução das Pectinases

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições operacionais da bioprodução das pectinases, foi utilizado um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (Screening Design) de 12 ensaios com 3 pontos centrais, sendo que em todos os ensaios do planejamento foi monitorado o comportamento cinético da produção das enzimas

(PMGL, PME, PGL E PE) por um período de até 96 horas. As variáveis e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Pectina (g/L)	X ₁	2,0	11,0	22,0
L- Asparagina (g/L)	X ₂	0	2,0	4,0
Extrato de levedura (g/L)	X ₃	0	10,0	20,0
Sulfato de magnésio (g/L)	X ₄	0	0,5	1,0
Fosfato de potássio (g/L)	X ₅	0	2,0	4,0
Sulfato de ferro (g/L)	X ₆	0	0,01	0,02

Variáveis Independentes Fixas: 30°C, 180 rpm, pH 5,5, até 96 horas de bioprodução.

2.1.3 Determinações analíticas

2.1.3.1 Atividade de Pectina liase (PMGL ou PL)

A atividade da pectina liase foi determinada segundo método descrito por Pitt (1988), onde foram determinados os produtos insaturados finais da degradação da pectina e o ácido tiobarbitúrico. Uma unidade da atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorvância à 550 nm, nas condições do ensaio (Pitt,1988).

2.1.3.2 Atividade de Pectato liase (PGL)

A atividade de PGL foi determinada pela formação de produtos insaturados a partir de ácido poligalacturônico (PGA) em espectrofotômetro a 230 nm (Moran et al., 1968). Uma unidade de atividade de PGL foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1µmol de produtos insaturados por mililitro da cultura por minuto, utilizando-se para cálculo o coeficiente de absorção molar do produto insaturado como sendo de 5.200 L/cm.mol.

2.1.3.3 Atividade de Pectina esterase (PE)

A determinação da pectina esterase foi através de determinação colorimétrica em verde de bromocresol com 0,5 % de pectina cítrica e leitura em espectrofotômetro a 617 nm.

Uma curva padrão de ácido galacturônico a fim de determinar a equivalência entre $\Delta A_{617\text{ nm}}$ e μEq dos grupos carboxilato liberados (Vilariño et al., 1993).

2.1.3.4 Atividade de Pectinametilsterase (PME)

A atividade de pectinametilsterase (PME) foi determinada segundo Hultin et al., (1966). Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 μmol de NaOH/min.mL, nas condições do ensaio.

2.1.3.5 pH

O pH foi monitorado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento tipo Plackett-Burman com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade dos melhores tempos de bioprodução para cada enzima estudada. Observa-se na Tabela 2, a máxima atividade de Pectina Liase (17,10 U/mL) foi obtida em 48 horas no ensaio 4, onde o meio de cultivo apresentava 22 g/L de pectina, 20 g/L de extrato de levedura, 0,02 g/ de sulfato de ferro e 1,0 g/L de sulfato de magnésio. A enzima pectinametilsterase (PME) apresentou a máxima atividade (17100 U/mL) em 72 horas no ensaio 4.

Em todos os ensaios foi realizado o monitoramento do pH, onde se observou que o comportamento do pH é aleatório a produção de pectinases. Já as enzimas pectato liase (PGL) e pectinesterase (PE) apresentaram atividades muito baixas, sendo que a maior atividade de PGL foi observada no ensaio 6 (0,346 U/mL) e de PE nos ensaios 7 e 8 (0,429 U/mL).

A Figura 1 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a produção de pectina liase. Verifica-se que as variáveis pectina, extrato de levedura, e sulfato de ferro tiveram efeito significativo positivo no nível de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para o +1, possivelmente ocasionará um incremento na atividade enzimática. Entretanto, as variáveis L-asparagina, fosfato de potássio e sulfato de magnésio apresentaram efeito significativo negativo ($p < 0,05$), como L-asparagina, fosfato de potássio e sulfato de magnésio

no nível -1, a concentração foi nula, estas variáveis podem ser excluídas do processo fermentativo.

Tabela 2- Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores reais e codificados) e respostas em produção de pectina liase (PMGL), pectinametilesterase (PME), pectato liase (PGL) e pectinesterase (PE).

Ensaio	Variáveis Independentes*						Respostas em Atividade (U/mL)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	PMGL (48 horas)	PME (72 horas)	PGL (48 horas)	PE (72 horas)
1	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	12,59	13760,0	0,016	0,000
2	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	16,53	1790,0	0,000	0,003
3	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	-1 (0)	18,28	0,0	0,036	0,004
4	1 (22)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	25,63	17100,0	0,128	0,004
5	1 (22)	1 (4)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	10,79	1980,0	0,000	0,008
6	1 (22)	1 (4)	1 (20)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	15,51	11260,0	0,346	0,017
7	-1 (2)	1 (4)	1 (20)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	19,74	1490,0	0,000	0,429
8	-1 (2)	-1 (0)	1 (20)	1 (1)	1 (4)	-1 (0)	28,80	770,0	0,000	0,429
9	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (4)	1 (0,02)	21,24	0,0	0,000	0,009
10	1 (22)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (4)	1 (0,02)	20,89	2590,0	0,000	0,017
11	-1 (2)	1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,02)	20,87	0,0	0,000	0,002
12	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	12,59	1140,0	0,000	0,000
13	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	16,53	7260,0	0,034	0,009
14	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	18,28	7800,0	0,062	0,009
15	0 (11)	0 (2)	0 (10)	0 (0,5)	0 (2)	0 (0,01)	17,84	7487,0	0,042	0,008

*X₁= Pectina (g/L), X₂= L-Asparagina (g/L), X₃= Extrato de levedura (g/L), X₄= Sulfato de magnésio (g/L), X₅= Fosfato de potássio (g/L), X₆= Sulfato de Ferro (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C, pH 5,5.

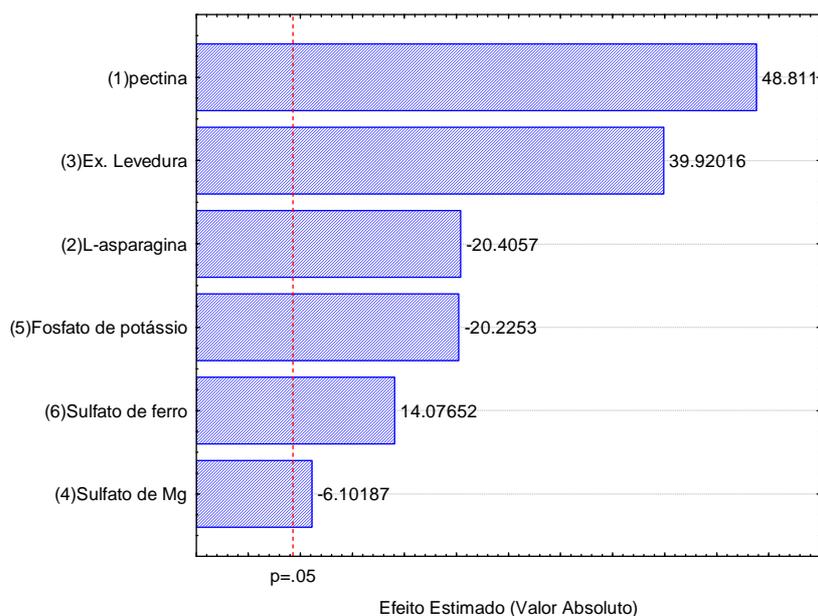


Figura 1 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett-Burman, para a produção de Pectina Liase (U/mL).

A Figura 2 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a produção de pectinametilesterase (PME). Verifica-se que as variáveis pectina, fosfato de potássio e sulfato de magnésio apresentaram efeito significativo positivo no nível de confiança de 95%. Já as variáveis L-asparagina, extrato de levedura e sulfato de ferro apresentaram efeito significativo negativo ($p < 0,05$), como estas variáveis no nível -1 , a concentração foi nula, também podem ser excluídas do processo fermentativo para uma maior produtividade.

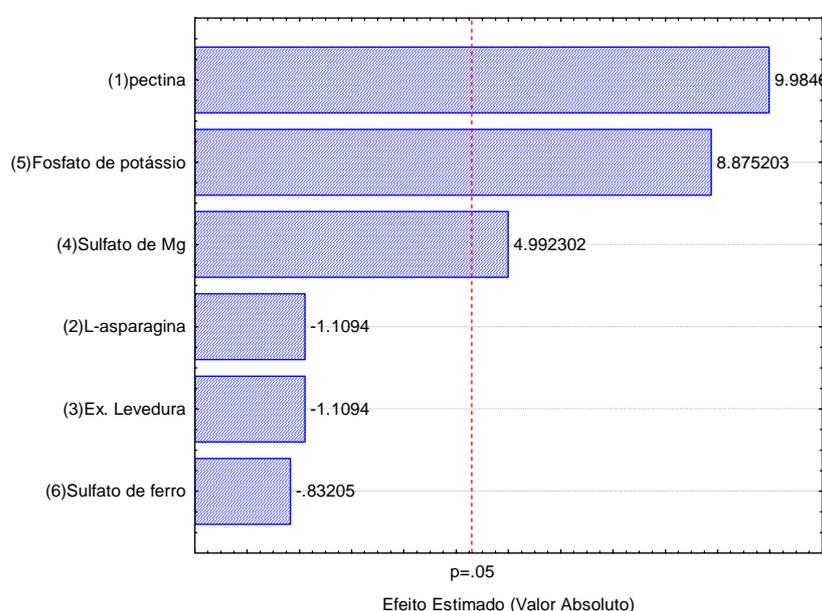


Figura 2 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a produção de Pectinametilesterase (U/mL).

3 CONCLUSÃO

A máxima atividade de Pectina Liase (17,10 U/mL) foi obtida em 48 horas e da pectinametilesterase (17100 U/mL) foi obtida em 72 horas no meio de cultivo composto por 22 g/L de pectina, 20 g/L de extrato de levedura, 0,02 g/L de sulfato de ferro e 1,0 g/L de sulfato de magnésio, a 180 rpm, 30°C e pH inicial de 5,5. No entanto, as enzimas pectato liase

e pectinesterase apresentaram valores muito baixos, sendo que a máxima atividade foi de 0,429 e 0,346 U/mL, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ALKORTA, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. L. (1997), Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 21-28.
- DARTORA, A. B., et al. Evaluation of fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation. *Naturforsch, UK*, v. 57, p. 666 - 670, 2002.
- FREIRE, D.M.G. Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 1996.
- HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 31, n. 3, p. 320-327, 1966.
- MORAN, F., NASUNO, S., STAN, M.P. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminase of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophysic*, v.123, p.298-306, 1968.
- PITT, M., Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: *Methods Enzymol.* v.161, p. 350-354, 1988.
- RESENDE, J.M.; CHITARRA, M.I.F.; MALUF, W.R.; CHITARRA, A.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. *Horticultura Brasileira* 22, n.2, p.206-212, 2004.
- VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J.F.; HOURS, R.A.; CASCONI, O. Spectrophotometric Method for Fungal Pectinesterase Activity Determination. *Technol. Argentina*, v. 26, p.107-110, 1993.