

Área: Engenharia de alimentos

AVALIAÇÃO DAS SUCESSIVAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Valeria Borszcz^{1,2*}, Geciane Toniazzo¹, Jamile Zeni¹,
Ana Paula Basso¹, Eunice Valduga¹

¹Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS

²Setor de Alimentos, Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Erechim, RS

*E-mail: valeria.b@erechim.ifrs.edu.br

RESUMO – As enzimas são catalisadores biológicos podendo ser produzidas por micro-organismos, que sob condições brandas de temperatura e pH provocam reações específicas. Poligalacturonases são enzimas pectinolíticas amplamente utilizadas no processamento de alimentos vegetais principalmente para clarificação de sucos e bebidas fermentadas. Para a viabilidade econômica na produção de enzimas, o extrato bruto obtido da fermentação deve ser recuperado, concentrado e purificado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi recuperar a enzima presente no meio fermentado através de sucessivos ciclos de extração, bem como avaliar a necessidade de homogeneização após o primeiro ciclo. A bioprodução da enzima exo-Poligalacturonase (exo-PG) foi obtida pelo micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642 pelo processo de fermentação em estado sólido durante um período de 96 h a 30°C. A extração das enzimas pectinolíticas foi realizada utilizando a solução extratora de NaCl (0,1M) nas condições de 30 °C, 180 rpm e 30 min. Os resultados obtidos apontaram que a recuperação da enzima é viável em etapas sucessivas, obtendo um rendimento máximo 63,2 U/g.

Palavras-chave: Pectinase, extração sólido-líquido, resíduo agroindustrial.

1 INTRODUÇÃO

As pectinases, também conhecidas como enzimas pectinolíticas, são classificadas de acordo com a preferência ao substrato (pectina, ácido pectico ou oligo-D-galacturnato), pela forma de ação (trans-eliminação ou hidrólise) ou pela clivagem radômica (endo ou exo). As poligalacturonases (endo e exo-PG) são enzimas pectinolíticas que catalisam a quebra das ligações α -1,4-glicosídica do ácido pectico (ácido poligalacturônico) e apresentam potencial aplicação em indústrias de alimentos, papel e têxtil, com o objetivo de melhorar a qualidade e aumentar o rendimento do produto final (KASHYAP *et al.*, 2001).

Aspergillus niger é o micro-organismo amplamente utilizado para a produção comercial das pectinases por ser considerado um micro-organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e reconhecido pelo seu uso seguro para a produção de alimentos. A tecnologia de fermentação em estado sólido oferece a possibilidade de aproveitamento de resíduos agroindustriais minimizando os efeitos da poluição e possibilitando a produção de metabólitos, biomassa e enzimas (GUMMADI e PANDA, 2003).

Após o processo de fermentação, procedimentos de recuperação são importantes para quantificar enzimas extracelulares e intracelulares. Essas enzimas podem ser retiradas do meio fermentado por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação por membrana ou combinação destes métodos (FELLOWS, 2006). Uma forma efetiva que permite estimar a quantidade total de enzima produzida na fermentação é realizando extrações sucessivas, com isso pode-se analisar o rendimento total do processo de extração avaliando a eficiência da lixiviação através de várias etapas (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, 2009). Em face disso, o objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de recuperação da enzima exo-PG produzida por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em fermentação em estado sólido por sucessivos ciclos de extração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de exo-Poligalacturonase

A cepa do fungo filamentos, *Aspergillus niger* ATCC 9642, pertencente ao estoque de cultura do laboratório de biotecnologia da URI Erechim, foi cultivada durante sete dias a 28°C em *erlemeyer* contendo meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA). Uma concentração de 5×10^6 esporos/g foi inoculada a uma mistura de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho na proporção de 8:1:1 (m/m), respectivamente e incubados a 30 °C, UR 98 % durante 96 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2 Avaliação de Sucessivas Etapas de Extração de exo-Poligalacturonase

Após o processo de fermentação, 10 g de meio sólido fermentado foram diluídos em 50 mL de NaCl (0,1 mol/L, Sigma), homogeneizados (30 °C, 30 min e 180 rpm), filtrados, prensado manualmente e a suspensão centrifugada (4.000 rpm, 15 min, 4 °C, MPW, modelo 351R), obtendo o extrato enzimático bruto (TONIAZZO *et al.*, 2013). Esta etapa corresponde ao primeiro ciclo de extração, no entanto 9 ciclos sucessivos de extração foram realizados.

Avaliou-se também a necessidade de efetuar o processo de homogeneização após cada ciclo de extração, para tanto foram desenvolvidos dois métodos, homogeneizado e não homogeneizado. Para o método homogeneizado, após o processo de filtração de cada ciclo, o meio sólido fermentado retido na peneira foi redirecionado para o *erlemeyer*, acrescentando 25 mL da solução extratora (NaCl 0,1M) e homogeneizado nas condições de 30°C, 30 min e 180 rpm. Para o método não homogeneizado, após o processo de filtração de cada ciclo o *erlemeyer* foi lavado com 25 mL da extratora (NaCl 0,1M) e o líquido foi adicionado diretamente na peneira onde se encontrava o meio sólido fermentado. Após cada ciclo de extração, para ambos os métodos, a

suspensão foi centrifugada (4.000 rpm, 15 min, 4 °C, MPW, modelo 351R) e do extrato enzimático bruto obtido determinou-se a atividade enzimática conforme descreve o item 2.3.

2.3. Análise da Atividade Enzimática

A atividade exo-PG foi avaliada adicionando 0,2 mL do sobrenadante (extrato enzimático) em 0,8 mL de solução de pectina (0,5 % pectina diluída em 200 mmol/L de tampão acetato de sódio, pH 5,5). As amostras foram incubadas a 37 °C por 6 min (GOMES *et al.*, 2011) e os grupos redutores do extrato enzimático foram determinados pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade da exo-Poligalacturonase foi expressa em unidade de atividade por grama de meio fermentado seco. Os ensaios foram realizados em triplicata.

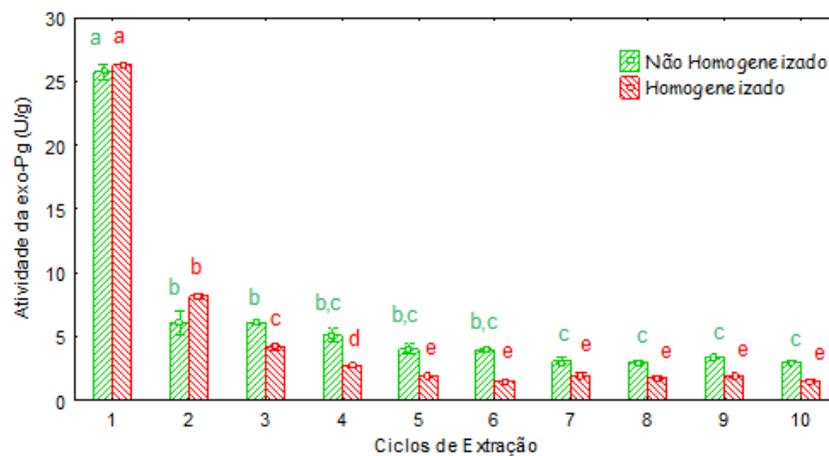
2.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o Software *Statistica* versão 8.0, a nível de significância de 95 %.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a atividade enzimática da exo-PG em relação aos 10 ciclos de extração. Verifica-se que o rendimento cai significativamente após o segundo ciclo e que partir do quinto ciclo a atividade da enzima pectinolítica manteve-se constante ($p < 0,05$), porém não extraíndo totalmente as enzimas do meio fermentado. É importante ressaltar que, tanto para o método com e sem homogeneização, o primeiro ciclo de extração foi conduzido da mesma maneira obtendo uma atividade enzimática de aproximadamente 26 U/g.

Figura 1 - Evolução da atividade enzimática de exo-PG de *A. niger* ATCC 9642 obtida por fermentação em estado sólido após sucessivas extrações do meio fermentado com e sem homogeneização.



*Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 % (Teste de Tukey).

Trabalhos semelhantes foram realizados por Castilho *et al.* (1999) e Diaz *et al.* (2007). Os primeiros autores avaliaram a evolução da concentração de pectinases produzidas pelo *A. niger* nos extratos oriundos de lavagens sucessivas e observaram que a atividade enzimática cai significativamente a cada nova extração, fornecendo, nas últimas passagens de solvente, extratos muito diluídos e uma atividade próxima de zero. Diaz e seus colaboradores avaliaram a eficiência da extração de casca de uva fermentada utilizando como solvente água destilada após seis ciclos e o resultado indicou que após o sexto estágio de extração mais enzimas poderiam ser separadas do sólido fermentado.

A Tabela 1 apresenta os valores da atividade enzimática cumulativa de exo-PG após sucessivos ciclos de extração observando-se um aumento expressivo da atividade ao longo dos 10 ciclos. Nota-se que até o quinto ciclo de extração não houve diferença significativa entre o método homogeneizado e não homogeneizado ($p < 0,05$), indicando não ser necessário o processo de homogeneização após o segundo ciclo, proporcionando então, uma diminuição no tempo de operação e gastos de energéticos. Observa-se também, que ao utilizar o método não homogeneizado, 146 % das enzimas foram recuperadas do meio fermentado obtendo um maior rendimento comparado com o método homogeneizado (91,6%).

Tabela 1 – Atividade enzimática cumulativa de exo-PG de *A. niger* ATCC 9642 obtida por fermentação em estado sólido recuperada após 10 ciclos de extração do meio fermentado.

Número de ciclos	Homogeneização		Não Homogeneizado	
	Atividade cumulativa (U/g)	Rendimento Cumulativo (%)	Atividade Cumulativa (U/g)	Rendimento Cumulativo (%)
1	26,3 ^{G,a}	-	25,7 ^{H,a}	-
2	33,2 ^{F,G,a}	26,2	32,5 ^{G,H,a}	26,4
3	37,3 ^{E,F,a}	41,8	38,4 ^{F,G,a}	49,4
4	40,0 ^{D,E,F,a}	52,1	43,5 ^{E,F,a}	69,2
5	41,8 ^{C,D,E,a}	58,9	47,5 ^{C,D,E,a}	84,8
6	43,4 ^{B,C,D,E,a}	65,0	51,1 ^{C,D,E,b}	98,8
7	45,3 ^{A,B,C,D,a}	72,2	54,1 ^{B,C,D,b}	110,5
8	47,0 ^{A,B,C,a}	78,7	57,1 ^{A,B,C,b}	122,2
9	48,0 ^{A,B,a}	82,5	60,2 ^{A,B,b}	134,2
10	50,4 ^{A,a}	91,6	63,2 ^{A,b}	146,0

Letras maiúsculas iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 % entre as colunas, letras minúsculas iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5 % entre as linhas (Teste de Tukey).

Singh *et al.* (1999) também otimizaram os parâmetros de recuperação da pectinase no processo de fermentação por *A. carbonarius* e observaram que após o terceiro ciclo aumentou de 10 para 42 U/mL no fim da terceira extração sequencial. Rodríguez-Fernández (2009) em seu estudo sobre a extração sucessiva da enzima pectinase produzida por fermentação em estado sólido, pelo fungo *A. niger* F3, após 96 h de fermentação, observou que aplicações de duas etapas de extração equivalem a duas fermentações, atingindo-se um rendimento de até 80%.

4 CONCLUSÃO

O trabalho demonstrou que as enzimas obtidas por fermentação em estado sólido podem ser recuperadas do meio fermentativo após vários ciclos de extração. Comparando os dois métodos de extração, homogêneo e não homogêneo, obtém-se um acréscimo de 24,1 e 37,5 U/g no valor da atividade enzimática após realização de mais 9 ciclos de extração, respectivamente. Os resultados indicaram que não há necessidade de etapas subsequentes de homogeneização, obtendo melhores rendimentos apenas lavando o meio fermentado com rendimento cumulativo de atividade de 146%.

5 AGRADECIMENTOS

À URI Erechim, FAPERGS, CAPES e CNPq.

6 REFERÊNCIAS

- CASTILHO, L.R.; ALVES, T.L.M.; MEDRONHO, R.A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 181–186, 1999.
- FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, 281–287, 2011.
- GUMMADI, S.; PANDA T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.
- KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K. ; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, 215-227, 2001.
- MILER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, V. 31, n.3, 426-428, 1959.
- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D.E.; **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. Tese (Doutorado). Pós- Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2009.
- SINGH, S.A.; RAMAKRISHNA, M.; APPU RAO A.G. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus Carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 411–417, 1999.
- TONIAZZO, G.; BORSZCZ, V.; ZENI, J.; BASSO, A. P.; VALDUGA, E. Otimização do processo de extração de pectinases produzida por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em fermentação de estado sólido. **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, X Simpósio Hidrólise Enzimática e Biomass**, Foz de Iguazu/PR, 2013.