

Área: Engenharia de Alimentos

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA PECTINA LIASE DE *ASPERGILLUS NIGER* ATCC 9642

Márcia Maria Santin Trentini*, Ana Paula Rossetto, Alessandro Paulazzi, Eunice Valduga

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

**E-mail: marciasantin@yahoo.com.br*

RESUMO – A aplicação de enzimas em processos biotecnológicos e industriais é bastante ampla e diversificada, abrangendo diversas áreas, o uso de preparados enzimáticos mais puros e concentrados implicam em maior rendimento na sua aplicação, pois concentrações menores podem ser utilizadas. O objetivo deste trabalho foi concentrar a enzima pectina liase (PMGL) de *Aspergillus niger* ATCC 9642 utilizando carvão ativado como primeira etapa de um sistema de purificação. Fator de purificação de 4 vezes e recuperações acima de 145 % foram obtidos com este método. O uso de carvão ativado pode ser recomendado para uso industrial, pois o método mostrou-se eficiente.

Palavras-chave: enzima, concentração e carvão ativado.

1 INTRODUÇÃO

Pectinases comerciais são amplamente utilizadas na extração de sucos, porque elas degradam as substâncias pécicas, aumentam a quantidade de sólidos solúveis e proporcionam a diminuição da viscosidade do suco, promovendo assim a obtenção de sucos límpidos e de boas características sensoriais (KASHYAP et al., 2001). Estudos sobre estratégias de concentração e purificação de enzimas que utilizem processos simples e de baixo custo, mas que possibilitem alcançar altos fatores de purificação e recuperação da enzima, são importantes do ponto de vista industrial (OOI et al., 2009; MACIEL et al., 2014). Desta forma, insere-se o objetivo deste trabalho que foi a concentração da enzima pectina liase (PMGL) de *Aspergillus niger* ATCC 9642 utilizando carvão ativado como primeira etapa de um sistema de purificação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução de Pectinases

2.1.1 Micro-organismo

A cepa do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi agente biológico utilizado na bioprodução de enzimas pectinolíticas por fermentação em estado sólido e foi cultivada em elermeyer contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA, Merck), durante sete dias a 28 °C. Os esporos foram preservados sobre refrigeração até seu uso, não excedendo o prazo de 60 dias.

2.1.2 Substratos Agroindustriais

A casca de laranja, gênero Citrus e variedade Valência (resíduo da produção de suco) e o farelo de trigo foram obtida de comercial local (Erechim, RS). A água de maceração de milho foi cedida pela empresa Corn Products Brasil. O resíduo da casca de laranja foi previamente preparado, a semente e as partes internas da casca (endocarpo) foram removidos manualmente. A casca (albedo e flavedo, umidade de 75 %) foi triturada em um processador de alimentos. O farelo (umidade de 11 %) e a água de maceração (umidade de 56 %) foram utilizados da forma adquirida.

2.1.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido foi realizada em béquer de polipropileno de 500 mL, contendo uma mistura composta por casca de laranja triturada (9 g), farelo de trigo (4 g) e água de maceração de milho (7 g). O béquer foi coberto com manta bacteriológica e recoberto com folha laminada, esterilizado em autoclave vertical (Phoenix, modelo AV 75) por 15 min a 1 atm e resfriado à temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota de suspensão de esporos ($5,0 \times 10^7$) foi inoculada sobre a mistura de substratos. O meio fermentativo foi incubado em câmara de germinação (Tecnal, modelo TE 401) em temperatura de 30°C e umidade relativa controlada por 84 horas. Ressalta-se, que para manter a umidade relativa e temperatura do meio foi injetado ar úmido saturado.

2.2 Concentração e pré-purificação com carvão ativado

O carvão ativado em pó (Alpha, Brasil - LA 810) foi utilizado nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 40 e 60 g/L sendo utilizado para avaliar a eficiência na remoção de compostos de cor, possíveis sólidos suspensos e proteínas. O extrato foi mantido em contato com o carvão por um período de 30 min sob agitação orbital de 100 rpm a temperatura ambiente ($\pm 23^\circ\text{C}$). Após as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para análise da atividade da enzima segundo Miller (1959) e da proteína segundo Bradford (1976).

2.3 Determinação dos parâmetros de purificação/concentração

2.3.1 Fator de purificação

O fator de purificação (FP) foi calculado através da Eq. 1 (OOI et al., 2009; ANTOV E OMORJAN, 2009; MEHRNOUSH et al., 2011), sendo uma medida para acompanhar os sistemas de purificação.

$$FP = \frac{A_f}{A_i} \quad (1)$$

Onde, Af = atividade específica da enzima da fase (U/mg); Ai = atividade específica do extrato bruto inicial (U/mg) (extrato bruto antes do equilíbrio de fases (SAB) ou da precipitação).

2.3.2 Recuperação da enzima

A recuperação (R) da enzima foi calculada pela Eq. 2 (OOI et al., 2009; ANTOV E OMORJAN, 2009; MEHRNOUSH et al., 2011).

$$R = \frac{A_f \times V_f}{A_i \times V_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde, Af = atividade total do extrato enzimático da fase (U/mL); Ai = atividade total do extrato bruto na alimentação (U/mL); Vi = volume inicial do extrato bruto adicionado em mL; Vf = volume da fase em mL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados do fator de purificação e recuperação da enzima PMGL.

Tabela 1. Fator de purificação e recuperação da enzima PMGL.

Ensaio	Carvão (g/L)	PMGL	
		FP	R (%)
1	1	1,59	145
2	5	2,38	182
3	10	2,91	191
4	20	4,26	199
5	40	8,31	209
6	60	15,89	213

Os resultados mostram que com o aumento da concentração do carvão ativado houve aumento no fator de purificação e na recuperação da enzima PMGL. O ensaio que obteve o melhor resultado foi o ensaio 6, o qual obteve fator de purificação de 15,89 vezes, utilizando 60 g/L de carvão ativado. Recuperações de 145 a 213 %

foram obtidas utilizando o carvão ativado como precipitante, mostrando que o método de precipitação é eficiente na pré-purificação da enzima em estudo.

Valores de recuperação da enzima superiores a 100 %, possivelmente, podem ser atribuídos a dois motivos: i) há remoção de metabólitos ou metabólitos secundários durante a purificação, que inibem a atividade da enzima, e ii) a elevada concentração de sal e/ou proteína, os quais ajudam a manter a conformação da proteína na forma ativa (PAN et al., 2001).

Dey et al. (2014) observaram alta purificação de poligalacturonases, 38,4 vezes, com recuperação de 69,8 % da atividade após o tratamento da solução pectinolítica com 10 g/ml de carvão ativado. Nakkeeran et al. (2010), utilizando 5 g/L de carvão ativado, mostraram que 83 % de compostos corantes foram removidos sem perda significativa de atividade de poligalacturonase.

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que com o aumento da concentração do carvão ativado houve aumento no fator de purificação e na recuperação da enzima PMGL, sendo possível obter fator de purificação de 4 vezes e recuperações acima de 145 %. O uso de carvão ativado como primeira etapa de um sistema de purificação pode ser recomendado para uso industrial, pois o método mostrou-se eficiente.

5 AGRADECIMENTOS

À URI e a CAPES pelo apoio financeiro e bolsas de estudos disponibilizadas para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- ANTOV, M.; OMORJAN, R. Pectinase partitioning in polyethylene glycol 1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system: statistical modeling of the experimental results. *Bioprocess Biosyst Engineering*, v. 32, p. 235–240, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-drye binding. *Anal. Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DEY T.B., ADAK, S., BHATTACHARYA, P., BANERJEE R. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT – Food Science Technology*. 59: 591-595, 2014.
- KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 215-227, 2001.
- MACIEL, M. H. C.; OTTONI C. A.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; SANTOS, C.; LIMA, N.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C.. “Purification of polygalacturonases produced by

Aspergillus niger using an aqueous two-phase system”, *Fluid Phase Equilibria* DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fluid.2014.03.018>

MEHRNOUSH, A.; SARKER, MD. Z. I.; MUSTAFA, S.; YAZID, A. M. M.. Direct Purification of Pectinase from Mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) Peel Using a PEG/Salt-Based Aqueous Two Phase System. *Molecules*, v. 16, 8419-8427, 2011.

MILLER, G. L. “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, p. 426 - 428, 1959. Nakkeeran, E.; Subramanian, R.; Umesh-Kumar, S. Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. *Journal Biosci. Bioeng* 109:101–106, 2010.

NAKKEERAN, E.; SUBRAMANIAN, R.; UMESH-KUMAR, S. Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. *Journal Biosci. Bioeng* 109:101–106, 2010.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1083–1087, 2009.

PAN, I. H.; YAO, H. J.; LI, Y. K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningi* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p.196-201, 2001.