

Área: Engenharia de Alimentos

INFLUÊNCIA DO pH NA PRODUÇÃO DE EXO-POLIGALACTURONASE POR *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Valeria Borszcz*, Ana Paula Basso, Jamile Zeni, Geciane Toniazzo, Eunice Valduga

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

Departamento de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Erechim, RS

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

RESUMO - A exo-poligalacturose (exo-PG) é uma enzima presente em vegetais e que também podem ser produzidas por micro-organismos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do pH (2,5-6,5) e diferentes tempos, na produção da exo-PG por *Aspergillus niger* ATCC 9642 cultivado em estado sólido (casca de laranja *in natura*, farelo de trigo e água de maceração de milho). Os resultados mostraram que a máxima produção de exo-PG foi de 15,6 U/g_{bu} em pH 4,5. A utilização de resíduos sólidos agroindustriais apresenta uma alternativa promissora que pode ser aplicada à área da biotecnologia.

Palavras-Chave: Pectinases, resíduos agroindustriais, condições operacionais.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas pectinolíticas utilizadas na indústria de alimentos, química, biocombustível e têxtil destaca-se endo e exo-PG (poligalacturonase), PME (pectinametilesterase) e PMGL (pectina liase) produzidas por micro-organismos utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. As pectinases auxiliam no processo de extração, filtração, clarificação e aumento do rendimento de produtos como café, chá e óleo. Também podem ser utilizadas no processo de degomagem de fibras (algodão, rami, juta e linho) e na indústria de papel e celulose (JAYANI *et al.*, 2005; UENOJO e PASTORE, 2007).

Há duas tecnologias apropriadas para a produção de enzimas, o cultivo em estado sólido (CES) e submerso (CS). Muitos são os fatores que influenciam no processo de cultivo para obtenção do produto desejado, tais como, cepa de micro-organismo, porosidade, dimensão e densidade das partículas sólidas, pH do meio, temperatura de incubação, tempo de fermentação, umidade relativa, atividade de água e fonte de nutrientes. O CES apresenta algumas vantagens em relação ao CS, pois o risco de contaminação por bactérias e

leveduras é consideravelmente menor, a recuperação da enzima extra-celular é facilitada e as condições de cultivo torna-se habitat natural para os fungos filamentosos (PANDEY, 2003).

Em face disso, o objetivo foi avaliar a influência do pH na bioprodução de exo-PG por *A. niger* ATCC 9642 empregando resíduos agroindustriais (casca de laranja triturada, farelo de trigo e água de maceração de milho).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES) foi realizado em béquer de polipropileno de 500 mL contendo uma mistura composta por 16 g de casca de laranja triturada, 2 g de farelo de trigo, 2 g de água de maceração de milho e suspensão de 5×10^6 esporos de *A. niger* ATCC 9642. O meio de cultivo (65 % umidade, pH 4,3) foi incubado em câmara de germinação (Tecnal, modelo TE401) em umidade relativa controlada, na temperatura de 30 °C.

A casca de laranja, gênero *Citrus*, variedade Valência (resíduo da produção de suco) e farelo de trigo (*Triticum aestivum*) foram obtidos de estabelecimento comercial local (Erechim, RS). A água de maceração de milho foi cedida pela empresa *Ingredion* Brasil (Mogi Guaçu, SP). O resíduo da casca de laranja foi previamente preparado, sendo que, as sementes e as partes internas da casca (endocarpo) foram removidas. A casca (albedo e flavedo) foi triturada em processador de alimentos (Walita, modelo Master). O farelo de trigo e a água de maceração de milho foram utilizados na forma adquirida. A mistura (8:1:1, m:m:m) foi esterilizada em autoclave vertical (Phoenix, modelo AV75) por 15 min a 1 atm, seguido de resfriamento a temperatura ambiente.

Ensaio de produção de exo-PG foram realizados em diferentes valores de pH (2,5 a 6,5) inicial do meio, ajustando o pH com soluções tampão de 0,2 mol/L citrato-ácido clorídrico (2,5-4,0) e 0,2 mol/L fosfato-hidróxido de sódio (4,5-6,5) em 96 h.

Em paralelo foram realizados ensaios da cinética de bioprodução de exo-PG durante 240 h de cultivo. As amostras (triplicata) foram coletadas em intervalos de tempos de 24 h.

2.2 Recuperação da enzima

Após a incubação recuperou-se a enzima exo-PG empregando-se 10 g de meio de cultivo, diluídos em 50 mL de solução de 0,1 mol/L de NaCl (Sigma) e submetidos a extração a 175 rpm, 20°C, durante 30 min. O extrato enzimático foi separado do micélio e meio sólido por filtração, seguido de centrifugação a 4°C, 4000 x g por 15 min. A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante.

2.3 Avaliação da atividade enzimática

A atividade da exo-PG foi mensurada pela quantificação dos grupos redutores, usando o método de ácido dinitrosalisílico (DNS) proposto por Miller (1959). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a

quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$), nas condições de reação e segundo a curva padrão estabelecida, utilizando ácido α -D-galacturônico monoidratado como açúcar redutor na faixa de 0 a 1 mg/mL. A atividade da exo-poligalacturonase foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/g_{bu}).

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram representados mediante média (triplicata) e barra de erro (desvio padrão), tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as diferenças das médias pelo teste de Tukey, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, a nível de significância de 95 % de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados da influência do tempo de cultivo em estado sólido (0-240 h) na bioprodução da exo-PG por *A. niger* ATCC 9642 (5×10^6 esporos/ g_{bu}) utilizando uma mistura de resíduos agroindustriais (casca de laranja, farelo de trigo, água de maceração de milho, na proporção de 8:1:1 m:m:m, 65% de umidade, pH 4,3). Observa-se que a maior produção de exo-PG foi de 10,61 U/g_{bu} (30,1 U/g_{bs}) obtida em 216 h, porém não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre 48 a 240 h.

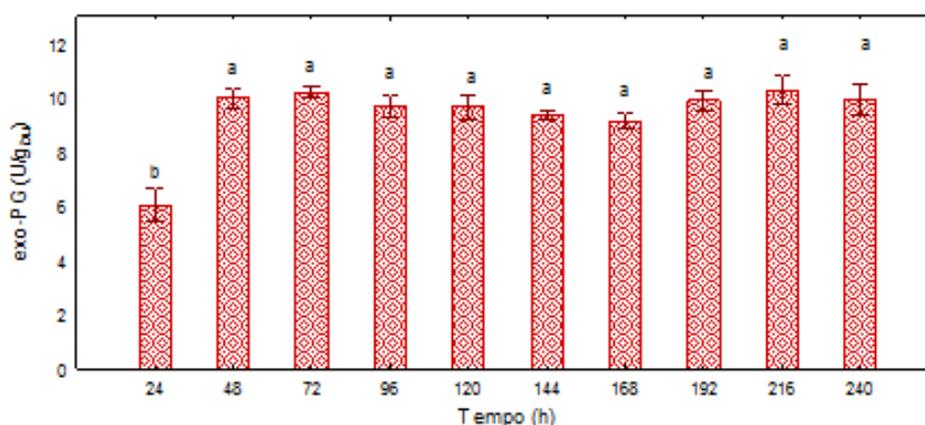


Figura 1. Atividade da exo-PG em diferentes tempos de fermentação (0 a 240 h). Condições de fermentação: casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), 30 min, 20 °C, 175 rpm. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % (Teste de Tukey).

Na literatura encontram-se citados alguns trabalhos relacionando a produção de pectinases em CES em função dos substratos e tempo de cultivo utilizando fungos filamentosos. Silva *et al.* (2005) avaliaram a produção de pectinases por *P. viridicatum* RFC3 utilizando uma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1, m:m) e obtiveram atividade máxima de 46,4 U/g (70 % de umidade) em 336 h. Souza *et al.* (2010), Díaz *et al.* (2012) e Heerd *et al.* (2012) também avaliaram o tempo na produção de pectinases por fungos filamentosos cultivados em

resíduos agroindustriais, conforme relatado por Borszcz *et al.*(2012), e a máxima produção foi obtida em 66 h (20,9 U/g) , 96 h (15,0 U/g_{bu}) e 96 h (19,5 U/g_{bs}), respectivamente, resultados estes inferiores ao encontrado neste estudo, quando comparado com o valor da atividade em base seca (30,1 U/g_{bs}).

A Figura 2 apresenta os resultados de produção de exo-PG em diferentes valores de pH (2,5 a 6,5). Observa-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) na produção de exo-PG, obtendo aproximadamente 14,0 U/g_{bu} (40,0 U/g_{bs}) na faixa de pH de 4 a 6,5. No entanto, em valores de pH abaixo de 4,0 houve redução da atividade pectinolítica. Tari *et al.* (2008) relatam que dependendo da fonte microbiana o pH ótimo para a máxima atividade de poligalacturonase, em geral, encontra-se entre os valores de 3,5 e 5,5.

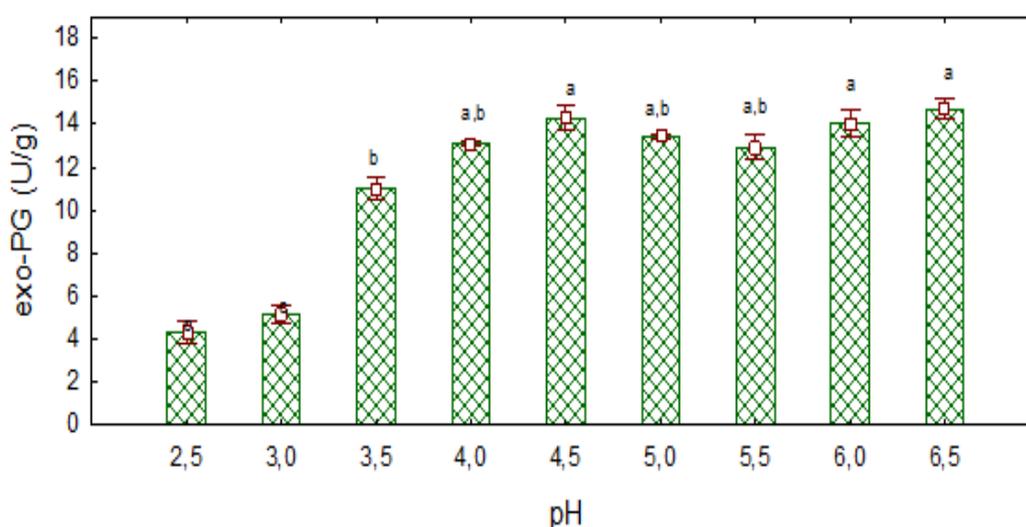


Figura 2. Produção de exo-PG em diferentes valores de pH. Condições de bioprodução: meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g, 96 h. Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), 30 min, 20 °C, 175 rpm. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % (Teste de Tukey).

Portanto, para obtenção da máxima produção de exo-PG, nas condições deste estudo, torna-se necessário o ajuste do pH inicial do meio de cultivo e/ou utilizar na composição dos substratos agroindustriais que apresentem valores de pH na faixa de 4,5 a 6,5.

4 CONCLUSÕES

A máxima atividade enzimática da exo-PG foi de 15,6 U/g_{bu} ao empregar meio composto de casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 65 % de umidade, 30°C, 5×10^6 esporos/g, 96 h e pH 4,5.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à CAPES e à FAPERGS pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- BORSZCZ, V.; BASSO, A. P.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; VALDUGA, E. Avaliação das condições de cultivo na produção de exo-poligalacturonase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em fermentação em estado sólido. XVII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e XIII Encontro de Iniciação Científica, 2012, Erechim /RS. XIII Encontro de Iniciação Científica, 2012.
- DÍAZ, A.B; ORY, I.; CARO, I; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 72-78, 2012.
- HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHOURE, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: a comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 102-110, 2012.
- JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005b.
- SOUZA, R.L.A.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H.; AMORIM, B.C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 987-992, 2010.
- TARI, C.; DOGAN, N.; GOGUS, N. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 824-829, 2008.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-395, 2007.