

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação da temperatura e pH ótimos de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em Cultivo em Estado Sólido

Valeria Borszcz^{1,2}, Taisa Renata Piotroski Boscato¹, Eloane Malvesi³, Denise Oliveira
Guimarães⁴, Jamile Zeni¹, Geciane Toniazco Backes¹, Eunice Valduga^{1*}

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI)
99709-910, Erechim, RS, Brasil, E-mail: veunice@uricer.edu.br.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS),
99713-028, Erechim, RS, Brasil.

³Universidade de Caxias do Sul (UCS), Instituto de Biotecnologia
95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
27933-378, Macaé, RJ, Brasil.

RESUMO

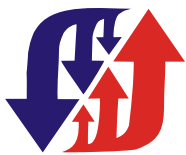
*Enzimas pectinolíticas são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos e bebidas e podem ser produzidas por micro-organismos utilizando resíduos agroindustriais, como alternativa de tecnologia limpa. Parâmetros de temperatura e pH são fatores que interferem na velocidade da reação enzimática de processos de extração de aromas, óleos essenciais e pigmentos, clarificação de sucos e vinho. O presente estudo teve por objetivo avaliar a temperatura e pH ótimos de reação de pectinases (exo-poligalacturonase - exo-PG, pectinametilesterase - PME e pectina liase - PMGL) produzida por *Aspergillus niger* ATCC 9642, cultivado em meio composto por casca de laranja, farelo de trigo e água de maceração de milho. Um planejamento fatorial completo 2² foi realizando e os resultados apontaram pH e temperatura ótimos dos extratos enzimáticos brutos da exo-PG, PME e PMGL de 5,0 e 50°C, 9,8 e 45°C e 5,5 e 55°C, com atividade enzimática de 26,2; 67,2 e 107,65 U/g_{bu}, respectivamente.*

Palavras-chave: Poligalacturonase, pectinametilesterase, pectina liase, resíduos agroindustriais.

INTRODUÇÃO

Nas reações enzimáticas, as enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes das células, denominados de substratos. As enzimas convertem substratos em diferentes moléculas, chamadas de produtos. Portanto, atuam sobre um substrato, exigindo condições adequadas para sua ativação, tais como, tempo, temperatura, pH e quantidade e qualidade de substrato (KASHYAP *et al.*, 2001).

Pectinases ou enzima pécnicas são enzimas que apresentam ação catalítica específica e atuam pela preferência no grau de esterificação metílica do substrato (pectina ou ácido pécnico), pelo tipo de ruptura aos enlaces glicosídicos (hidrolítica ou trans-eliminativo) e pelo mecanismo de quebra das ligações glicosídicas, se ocorre ao acaso (endo) ou a partir das extremidades não redutoras da cadeia (exo) (KASHYAP *et al.*, 2001; HEERD *et al.*, 2012). As poligalacturonases (PG) são enzimas pectinolíticas hidrolíticas que atua basicamente sobre a homogalacturonase das uniões glicosídicas entre os resíduos não esterificados (LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011). A pectina liase ou polimetilgalacturonase liase (PMGL) é uma



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

enzima que despolimeriza a pectina com alto grau de metoxilação diretamente por β -eliminação, resultando a formação de ácido galacturônico com uma insaturação entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado, causando uma rápida queda na viscosidade da solução do substrato. Esta enzima é particularmente interessante por despolimerizar pectinas sem alterar seu grau de esterificação e sem a necessidade de ação prévia de outra enzima do complexo pectinolítico (GUMMADI e KUMAR, 2005; YADAV *et al.*, 2009). A pectinametilesterase ou polimetilgalacturonase esterase (PME ou PMGE) é uma enzima importante na degradação da pectina, pois catalisa a remoção de grupos metilésteres, muito abundantes na pectina cítrica, que tem grau de esterificação variando entre 65 e 75 % (NIELSEN e CHRISTENSEN, 2002; JOLIE *et al.*, 2010).

Baseado neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o pH e a temperatura ótima das enzimas exo-PG, PME e PMGL produzidas por *A. niger* ATCC 9642 em cultivo em estado sólido (CES).

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo em estado sólido: meio composto por 9 g de casca de laranja, 4 g de farelo de trigo e 7 g de água de maceração de milho, 65 % de umidade, *Aspergillus niger* ATCC 9642, 5×10^6 esporos/ g_{bu} , 84 h.

Condições de extração: NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 10:1 (v:m), 180 rpm, 30 °C, 30 min. As enzimas foram recuperadas após processo de filtração e prensagem manual, seguido de centrifugação a 4°C, 4000 rpm e 15 min.

Atividade enzimática: As atividades foram expressas em unidade (U) por grama (g) em base úmida (g_{bu}): exo-PG (MILLER, 1959); PMGL (PITT, 1988) e PME (HULTIN *et al.*, 1966).

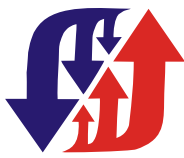
Caracterização parcial: pH e temperatura (planejamento fatorial completo 2^2) onde o pH variou de 3,09 a 5,91 (exo-PG e PMGL), 3,05 a 10,9 (PME) e a temperatura de 30 a 80°C (exo-PG e PMGL) e 24 a 66°C (PME).

Análise estatística: Os resultados foram tratados com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, ao nível de significância de 95 % de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As máximas atividades de exo-PG, PMGL e PME (Tabela 1) foram de 26,2 (Ensaio 9, 10 e 11); 107,65 (Ensaio 8) e 67,20 U/ g_{bu} (Ensaio 8), respectivamente.

As Equações 1, 2 e 3 apresentam os modelos codificados de segunda ordem que descrevem as atividades de exo-PG, PMGL e PME em função das variáveis analisadas (pH e temperatura). Os modelos foram validados pela análise de variância, os quais permitiram a construção de curvas de contorno (Figura 1).

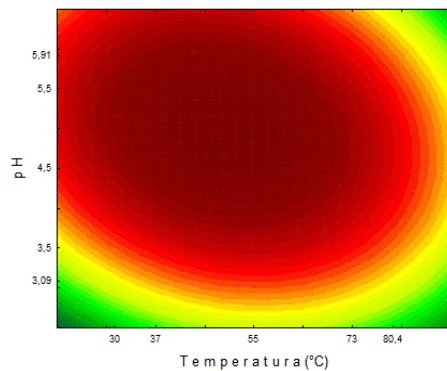


XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

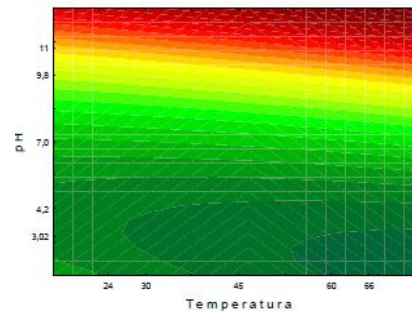
Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) em função da temperatura e pH e as respostas em atividade de Exo-PG, PMGL e PME (U/g_{bu}).

Ensaio	Variáveis independentes*		Exo- PG (U/g_{bu})	PMGL (U/g_{bu})	PME (U/g_{bu})
	X ₁	X ₂			
1	-1	-1	5,68	73,75	9,67
2	-1	1	5,95	57,60	12,00
3	1	-1	20,89	62,48	40,33
4	1	1	12,49	66,70	52,50
5	0	-1,41	20,84	55,23	21,67
6	0	1,41	11,18	66,35	21,00
7	-1,41	0	5,91	72,90	0,67
8	1,41	0	23,83	107,65	67,20
9	0	0	26,23	93,48	21,00
10	0	0	25,67	91,05	21,67
11	0	0	26,16	92,55	20,67

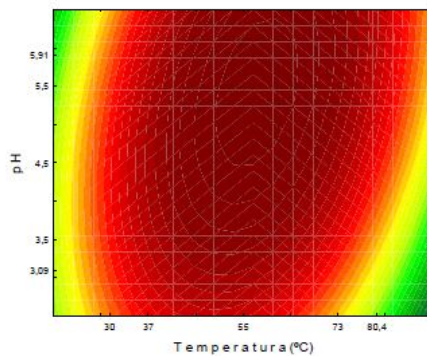
*X₁=pH (Exo-PG e PMGL: -1,41 = 3,09; -1 = 3,5; 0 = 4,5; 1 = 5,5; 1,41 = 5,91; PME: -1,41 = 3,05; -1 = 4,2; 0 = 7,0; 1 = 9,8; 1,41 = 10,9), X₂=Temperatura, °C (Exo-PG e PMGL: -1,41 = 30; -1 = 37; 0 = 55; 1 = 73; 1,41 = 80; PME: -1,41 = 24; -1 = 30; 0 = 45; 1 = 60; 1,41 = 66).



(a)

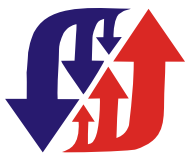


(b)



(c)

Figura 1: Curvas de contorno para a atividade da exo-PG (a), PME (b) e PMGL (c) em função do pH e da temperatura.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Modelos codificados

$$\text{Exo-PG} = 26,03 + 5,90(X_1) - 6,65(X_1)^2 - 2,73(X_2) - 6,08(X_2)^2 - 2,17(X_1.X_2) \quad (1)$$

$$\text{PME} = 21,10 + 20,68(X_1) + 6,69(X_1)^2 + 1,70(X_2) + 2,45(X_1.X_2) \quad (2)$$

$$\text{PMGL} = 92,40 + 6,18(X_1) - 3,81(X_1)^2 - 18,65(X_2)^2 + 5,72(X_1.X_2) \quad (3)$$

Onde: exo-PG = Atividade de exo-poligalacturonase (U/g_{bu}); PME = Atividade de pectinametilesterase (U/g_{bu}); PMGL = Atividade de pectina liase (U/g_{bu}); X₁ = pH; X₂ = Temperatura (°C).

CONCLUSÕES

As máximas atividades de exo-poligalacturonase (26 U/g_{bu}), pectinametilesterase (67 U/g_{bu}) e pectina liase (107 U/g_{bu}) foram obtidas em pH e temperatura ótimos na região próxima de 4,5 e 55°C, 10,9 e 45°C e 5,91 e 55°C, respectivamente. A caracterização das pectinases é etapa importante para direcionar as futuras aplicações industriais das enzimas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heerd D, Yegin S, Tari C, Fernandez-Lahore M. 2012. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: a comparative study. *Food Bioproc* 90:102-110.
- Hultin HO, Sun B, Bulger J. 1966. Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. *J Food Sci* 31(3):320-327.
- Gummadi SN, Kumar DS. 2005. Microbial pectic transeliminases. *Biotechnol. Lett* 27: 451-458.
- Jolie RP, Duvetter T, Loey AMV, Hendrickx ME. 2010. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydr Res* 345:2583-2595.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Biores Technol* 77:215-227.
- Lara-Márquez A, Zavala-Páramo MG, López-Romero E, Camacho HC. 2011. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotech Letters*, 33:859-868.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination or reducing sugar. *Anal Chem*, 31:426-428.
- Nielsen JE, Christensen TMIE. 2002. Distribution of pectin methyl esterase and acetyl esterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography. *Plant Sci* 162: 799-807.
- Pitt D. 1988. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. pinodella. *Methods in Enzymology*, 161:350-354.
- Yadav S, Yadav PK, Yadav D, Yadav KDS. 2009. Pectin lyase: A review. *Process Biochem* 44: 1-10.