



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Aproveitamento de resíduo de processamento de maçã para a produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus oryzae*

Lenara Meneghel, Marieleme dos Santos, Betina Miglioranza, Marina Fabro,
Caroline Rossi, Eloane Malvessi e Mauricio Moura da Silveira

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: lmscatharina@ucs.br

RESUMO

*O nordeste do Rio Grande do Sul concentra os municípios maiores produtores de maçã do Brasil. Grande quantidade de bagaço é gerado como resultado do processamento da fruta. Este subproduto, rico em pectina, pode ter uso como indutor da produção de pectinases em cultivos fúngicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito indutor de diferentes concentrações de bagaço de maçã sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301, em processo submerso. Cultivos contendo bagaço de maçã seco e triturado, em concentrações de 20 a 80 g/L, foram conduzidos em frascos sob agitação. Verificou-se que, utilizando até 60 g/L de bagaço, houve indução da produção das enzimas, sendo que com 40 g/L foi possível atingir valores de atividade semelhantes àqueles obtidos no cultivo contendo pectina pura como indutor.*

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, pectinase, indução, bagaço de maçã, processo submerso.

INTRODUÇÃO

As pectinases, enzimas de grande aplicabilidade na indústria de alimentos e bebidas, podem ser produzidas por fungos filamentosos, geralmente do gênero *Aspergillus* (Uenojo & Pastore, 2007). Neste tipo de processo, a presença de pectina no meio de cultivo tem efeito indutor e favorece a excreção da enzima. No entanto, o alto valor comercial da pectina purificada eleva consideravelmente o custo do processo.

A utilização de resíduos agroindustriais ricos em pectina como indutores seria uma alternativa para unir baixo custo e sustentabilidade. Estudos demonstram que a incorporação destes resíduos em cultivos sólidos de fungos permite a obtenção de diversos produtos de interesse comercial (Kumari *et al.* 2014). Em processo submerso, no entanto, ainda que haja relatos anteriores, os estudos para utilização destes substratos avançaram especialmente na última década.

A maçã é uma fruta conhecida por seu alto teor de pectina, sendo uma das fontes de extração e produção industrial desse polissacarídeo. O nordeste do Rio Grande do Sul concentra os municípios maiores produtores de maçã do Brasil. Anualmente, cerca de 576.000 toneladas da fruta são colhidas, sendo que aproximadamente 30% deste montante são destinados ao processamento (IBGE, 2012). O bagaço resultante da extração de suco de maçã representa de 20 a 40% em massa do total processado (Sturza, 1995). Esse subproduto é composto por fibras e sólidos solúveis, geralmente açúcares, o que o torna um substrato adequado a diversos microrganismos (Chen *et al.*, 1988). A presença de cerca de 9% (em base úmida) de pectina (Downing, 1989) indica a possibilidade de uso deste bagaço como indutor da produção de pectinases em cultivos fúngicos. Mojsov (2010) utilizou polpa de maçã como



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

substrato para *Aspergillus niger* e obteve atividade de pectinases similar àquela alcançada em processo contendo pectina cítrica como indutor.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito indutor de diferentes concentrações de bagaço de maçã sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301, em processo submerso.

MATERIAL E MÉTODOS

O bagaço da maçã, proveniente de indústria produtora de sucos (Naturasuc - Farroupilha – RS), foi seco em estufa a 50°C para desidratação até peso constante e após triturado com auxílio de um moinho de facas, e armazenado a aproximadamente 4°C.

O microrganismo utilizado foi *A. oryzae* IPT-301, cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo. O meio de cultivo empregado no Ensaio Pectina foi o descrito por Meneghel *et al.* (2014), sendo composto de extrato de farelo de trigo (40g/L), glicose (5,0g/L), pectina (CPKelco, 20g/L), extrato de levedura (0,05g/L) e sais. Nos ensaios B20, B40, B60 e B80, a pectina foi substituída por 20, 40, 60 e 80g/L de bagaço de maçã, respectivamente. No Ensaio Controle, nem pectina nem bagaço estavam presentes no meio.

Os ensaios foram conduzidos em frascos sob agitação recíproca de 300rpm, a 28°C, por 120 horas. O pH inicial foi corrigido em 4,0.

Os açúcares redutores totais foram determinados conforme método descrito por Bitmann (1974). A atividade de pectinases foi estimada a partir da redução de viscosidade de uma solução padrão de pectina, pelo método descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi & Silveira (2004).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas Figuras 1 (A) e 1 (B), são mostrados os perfis de pH e atividade de pectinases nos ensaios conduzidos com diferentes concentrações de bagaço de maçã em comparação aos Ensaios Controle (sem indutor) e Pectina (contendo 20g/L de pectina pura como indutor). Observou-se que em concentrações de 20, 40 e 60g/L de bagaço, houve indução da produção das enzimas, uma vez que as máximas atividades obtidas (4,0, 5,9 e 4,8 U/mL) foram próximas ao resultado obtido no Ensaio Pectina (6,6 U/mL).

Conforme esperado, as atividades de pectinases medidas no Ensaio Controle, até 72h, foram baixas (menores que 1,0 U/mL), atingindo máximo de 1,9 U/mL em 96h de processo, apesar da ausência do indutor. Martínéz-Trujilo *et al.* (2009) já relataram, em cultivo de *Aspergillus flavipes*, que parte das enzimas do complexo pectinolítico formado é de ordem constitutiva, tendo verificado atividade de endo-poligalacturonases em níveis basais. No entanto, em B80, apesar da presença de bagaço de maçã, as atividades enzimáticas foram ainda menores que no Ensaio Controle. Possivelmente, a alta concentração de substrato no meio líquido dificultou a transferência de oxigênio para os microrganismos e, por serem estritamente aeróbios, o andamento do processo e a formação do produto podem ter sido comprometidos.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

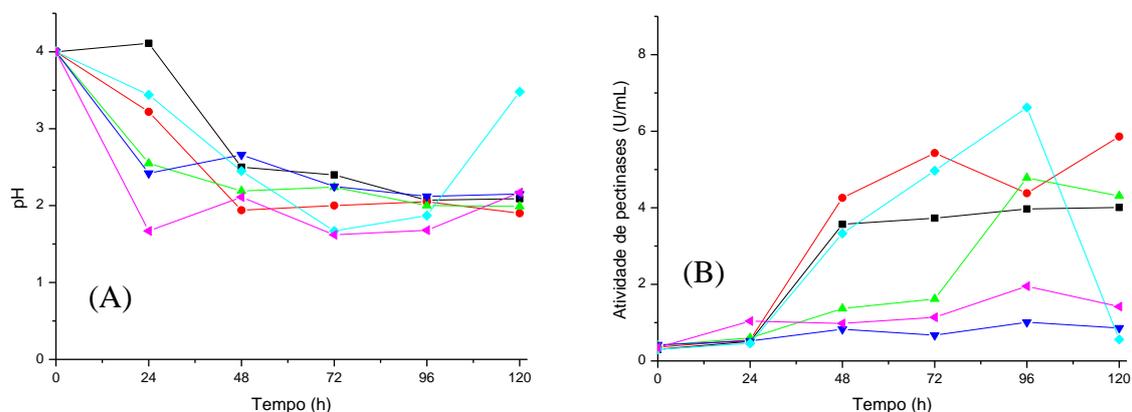


Figura 1: Variação dos valores de pH (A) e de atividade de pectinases (B) em cultivos de *Aspergillus oryzae* em frascos sob agitação com diferentes fontes de indutor: (◀) Controle; (◊) Pectina; (■) B20; (●) B40; (▲) B60; (▼) B80.

Com relação aos valores de pH (Figura 1 A), verificou-se que todos os cultivos apresentaram o perfil de queda característico deste processo, que tem relação com formação de ácidos orgânicos no metabolismo fúngico. Ainda, quanto maior foi a concentração de bagaço presente no meio, mais intensa foi a queda do pH, ou seja, valores mais baixos de pH foram atingidos. No Ensaio Pectina, no qual maior valor de atividade enzimática foi alcançada em relação às demais condições avaliadas, o pH alcançou valores inferiores a 2,0, já em 72h. Nos cultivos contendo bagaço, o ensaio B40 foi o que teve o menor valor de pH, em 48h, e, também, o que apresentou maior atividade enzimática. Malvessi & Silveira (2004), Fontana & Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014) já demonstraram que a produção de pectinases por *A. oryzae* está diretamente ligada ao perfil de pH do cultivo e que este decréscimo é necessário para a formação das enzimas. Nesse caso, se conduzidos em biorreator de bancada, onde o controle do pH pode ser realizado de modo efetivo, cultivos utilizando bagaço de maçã poderiam levar à obtenção de títulos enzimáticos ainda mais altos.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que bagaço de maçã seco e triturado é capaz de induzir a formação de pectinases por *A. oryzae* em processo submerso quando utilizado em baixas concentrações. A substituição da pectina purificada por este resíduo poderia reduzir o custo total do processo produtivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul, à FAPERGS, ao CNPq e à CAPES pelo apoio estrutural, financeiro e pela concessão de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bittman R. 1974. Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. *J Chem Education* 51: 49.
Chen H, Rubenthaler GL, Schanus EG. 1988. Effect of apple fiber and cellulose on the physical properties of wheat flour. *J. Food Sci.* 53(1): 304-305.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

- Downing DL. 1989. Processed apple products. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Fontana RC, Silveira MM. 2012. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. Braz. J. of Chem. Eng. 29: 683-690.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: ago.2015.
- Kumari BL, Sudhakar P, Hemamalini K, Sree NS, Vijetha P. 2014. Studies on pectinase production by *Bacillus subtilis* using agro-industrial wastes. Research J. of Pharmac. Biolog. And Chem. Sci. 5(6): 330-339.
- Maiorano AE. 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
- Malvessi E, Silveira MM. 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Braz Arch Biol Techn. 47: 693-702.
- Martínez-Trujillo A, Aranda JS, Gómez-Sánchez C, Aguilar BT, Aguilar-Osorio G. 2009. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. Braz. J. Microbiol. 40: 40-47.
- Meneghel L, Reis GP, Reginatto C, Malvessi E, Silveira MM. 2014. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. Process Biochem. 49: 1800-1807.
- Mojsov, K. 2010. The effects of different carbon sources on biosynthesis of pectinolytic by *Aspergillus niger*. App. Technol. Innovat. 3(3): 23-29.
- Sturza RCMC. 1995. Aproveitamento biotecnológico dos resíduos provenientes da extração do suco de maçã por fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- Uenojo M, Pastore GM. 2007. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. Quím. Nova. 30: 388-394.