

Influência da Pectina Cítrica na Produção de Poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 por fermentação Submersa



Resumo:

A poligalacturonase é uma enzima do grupo das pectinases que tem função de catalisar a degradação da molécula de pectina, um carboidrato presente na parede dos vegetais, em especial a lamela média, que confere rigidez a sua estrutura. Este trabalho objetivou avaliar a influência da pectina cítrica como indutor na produção de poligalacturonase (PG) de *Aspergillus aculeatus* URM4953 por fermentação submersa. Foram avaliados dois meios na produção da PG, um meio composto com a pectina presente em 2% farinha da casca do maracujá extraída por autoclavação (M1) e o segundo com o 2% de substrato da casca do maracujá na granulometria $\leq 0,5\text{mm}$ (M2). Em ambos os meios foram adicionadas diferentes concentrações de pectina cítrica. O controle não teve adição de pectina. Os dados mostraram que maiores concentrações de pectina cítrica diminuíram a produção de PG para M1 e aumentaram para M2. Entretanto o controle do meio M1 apresentou a maior atividade da PG 1,94 U/mL, sendo selecionada como a melhor condição para produção de PG por *Aspergillus aculeatus* URM4953 em fermentação submersa.

Abstract:

The polygalacturonase is an enzyme group from pectinases that catalyze the pectin molecule degradation, a carbohydrate present in the plant wall, in particular the middle lamellae that confers its rigid structure. This study evaluated the influence of citrus pectin to induce the polygalacturonase (PG) production from *Aspergillus aculeatus* URM4953 in submerged fermentation. Two mediums were evaluated in the PG production, a middle compound of pectin at 2% flour passion fruit peel extracted with autoclave (M1) and the second with 2% passion fruit peel from the substrate granulometry 0,5 to 1,0 mm (M2). In both meddle were added different concentrations of citrus pectin. The control was not added pectin. The data showed that greater citrus pectin concentrations decreased PG production to M1 and increased to M2. However, control of the meddle M1 showed the highest activity of PG 1.94 U/mL, being selected as the best condition for production of PG by *Aspergillus aculeatus* URM4953 in submerged fermentation.

**Jonatas Carvalho Silva¹,
Maria Eugênia Souto¹,
Ellyda Thamirys de Lima Pereira¹,
Allan Henrique Felix Melo¹,
Tatiana Souza Porto²**

¹Graduando em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Unidade Acadêmica de Garanhuns –UAG, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista - CEP: 55292-270.

² Professora da Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista - CEP: 55292-270 - Garanhuns/PE. E-mail: portots@yahoo.com.br

Contato principal:

Tatiana Souza Porto²



Palavras chave: Poligalacturonase, casca do maracujá, pectina

Keywords: Polygalacturonase, passion fruit peel, pectin



INTRODUÇÃO

A pectina é um polissacarídeo constituinte da parede celular de plantas dicotiledôneas, responsável pela adesão entre as células e pela resistência mecânica da parede celular. A protopectina, de natureza insolúvel, é facilmente hidrolisada por aquecimento, em meio ácido, formando pectina (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDOÑA; SOARES-JÚNIOR, 2010).

As pectinases são enzimas responsáveis pela degradação da pectina. São parte integrante das indústrias de suco de frutas e têxteis bem como tendo várias aplicações biotecnológicas (KASHYAP et al., 2001). O substrato utilizado para a produção de pectinases são as substâncias pécticas. As substâncias pécticas, carboidratos poliméricos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação (KOBLOITZ, 2008). Os micro-organismos constituem uma fonte rica de muitas enzimas sendo as pectinases, particularmente as produzidas por fungos, de grande importância industrial (ONOFRE et al, 2008).

Com base no seu modo de ação, as pectinases são classificadas em poligalacturonase, pectina liase e pectina esterase. Poligalacturonase são ainda classificadas em endopoligalacturonase (CE 3.2.1.15) e exopoligalacturonases (CE 3.2.1.67) que hidrolisam os internos e externos - (1,4) ligações glicosídicas de pectina, respectivamente. Pectina liase (CE 4.2.2.10) rachadas - (1,4) ligações glicosídicas por transelimination, o que resulta em galacturonato com duplo ligação entre C-4 e C-5 na extremidade não redutora, enquanto pectina esterase (EC 3.1.1.11) catalisa a hidrólise de metilo grupo para produzir pectina e metanol (REHMAN; QADER; AMAN, 2012). As poligalacturonases (PG) são o maior grupo de enzimas que despolimerizam a pectina/ácidos pécticos por clivagem das ligações glicosídicas em reações de hidrólise (PALANIVELU, 2006). A poligalacturonase é a principal enzima despolimerizante de interesse comercial (SOUZA et al., 2010). A produção fermentativa destas enzimas exige especial atenção à composição do meio de cultura, uma vez que pode conter componentes que participam na indução, repressão ou a inibição da formação e secreção da enzima a cada estirpe de interesse (TARI; DOGAN; GOGUS, 2008). Assim o presente trabalho objetivou verificar a influência da pectina cítrica como um indutor na produção de poligalacturonase (PG) de *Aspergillus aculeatus* URM4953 por fermentação submersa utilizando dois

meios diferentes compostos com o substrato casca do maracujá.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Micro-organismo

O micro-organismo *Aspergillus aculeatus* URM4953, foi obtido da coleção de cultura da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco e mantido em tubos inclinados em óleo mineral e reativados em Frascos Erlenmeyers 125mL contendo 50mL de meio de cultura composto de peptona 1%, glicose 2% e extrato de levedura 0,3%. O crescimento ocorreu durante 72h, 120 rpm a 30°C. Os esporos foram coletados com a adição de 3 mL de solução de NaCl (0,9%) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. O fungo foi inoculado em Erlenmeyers 125 mL contendo meio de cultura Czapek incubado a 30°C por 7 dias em estufa.

b) Tratamento do Substrato.

O substrato utilizado para fermentação foi a casca do maracujá. A fruta foi submetida ao tratamento de lavagem e mantida em solução de hipoclorito de sódio 2% durante 1 hora seguida de enxague com água corrente e água destilada, retirada da polpa, trituração, secagem em estufa com circulação de ar a 65°C até completa desidratação e granulometria em peneiras de aço com mesh 0,5 a 1,0 mm. Parte do substrato de maracujá foi processado em moedor para obtenção da farinha. Ambos os substratos foram armazenados em recipientes herméticos a temperatura ambiente.

c) Fermentação submersa (FSm)

Dois meios de fermentação foram utilizados para produção da PG. O primeiro meio foi constituído pela farinha da casca do maracujá (MF). Preparou-se uma solução de 2% com a farinha e água deionizada. Esta mistura foi autoclavada por 20 min a 121°C e 1 atm para extração da pectina e açúcares redutores presentes na farinha. Após extração a mistura foi filtrada para retirada de sólidos em suspensão. Foi adicionado ao meio os sais [0,01% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,09% de K_2HPO_4] e 0,1% de extrato de levedura. O meio foi autoclavado novamente para esterilização.

O segundo meio foi composto por uma solução de 2% do substrato (0,5 - 1,0mm) em água deionizada (MR). Foram adicionados os sais citados a cima ao meio e 0,1% de extrato de levedura. Em seguida o

meio foi autoclavado para esterilização.

O uso da pectina como indutor na fermentação foi avaliada adicionando-se aos meios diferentes concentrações de pectina cítrica 0; 5,0; 1,0 e 1,5% em ambos os meios. O controle foi realizado sem adição de pectina cítrica. A fermentação ocorreu com 50 mL dos meios em Erlenmeyer de 250 mL, concentração de 10^5 esporos/mL incubada a 30°C, sob agitação orbital 130rpm, por 72h. Após este tempo o fermentado foi filtrado e centrifugado por 5min a 4000 rpm. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático bruto e foi armazenado sob congelamento (-20°C).

d) Atividade de Poligalacturonase (PG - E.C.3.2.1.67)

A atividade da exo-PG foi determinada como o proposto por Miller, 1959, misturando 500 µL de uma solução de pectina cítrica 1,0% em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 incubado a 40°C por 15 minutos, para estabilização de temperatura e 500 µL de extrato enzimático, incubado a 40°C por 40 minutos em banho-maria. Após decorrido este tempo, foi retirado 100µL desta mistura de reação e adicionou-se 1 mL de solução de DNSA, a mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos para formação de cor, resfriados em banho de gelo e adicionados 5,0 mL de água destilada e agitado em vórtex. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade enzimática foi calculada de acordo com curva padrão estabelecida com ácido α -D-galacturônico como açúcar redutor. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido galacturônico por minuto (U/mL = µmol/mL.min).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da produção da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 para os meios M1 e M2 estão representados na Tabela 1. Como pode ser observado o aumento da concentração de pectina cítrica ao meio M1 diminuiu a produção da PG. Esse comportamento difere dos resultados encontrados por Sandri, Fontana, Silveira (2014), pois estes autores observaram que no meio que não houve adição de pectina cítrica a produção da PG foi inferior e que ao utilizar crescentes concentrações de pectina cítrica, as atividades mais elevadas da PG foram obtidas. Isto indicou que a produção de PG por *Aspergillus fumigatus* foi positivamente afetada pela presença deste indutor. Fontana e Silveira (2012) também

observaram que a produção da PG de *Aspergillus oryzae* também aumentou em maiores concentrações de pectina cítrica. Entretanto, como pode ser observado na Tabela 1, as concentrações de açúcares redutores foram maiores em concentrações de pectina mais elevadas. De acordo com Fontana, Salvador e Silveira (2005), altas concentrações de açúcares redutores diminui a produção de PG por repressão catabólica. Segundo Fawolea e Odunfa (2003) na presença alta de glicose o micro-organismo não precisa produzir PG para degradar a pectina que serve de fonte de carbono em seu crescimento.

Tabela 1. Produção de poligalacturonase por *Aspergillus aculeatus* URM4953 produzidos em diferentes meios de fermentação

% Pectina Cítrica	Açúcares redutores (mg.mL ⁻¹) (M1)*	Açúcares redutores (mg.mL ⁻¹) (M2)*	Atividade da PG (U.mL ⁻¹) (M1)	Atividade da PG (U.mL ⁻¹) (M2)
Controle	0,31	0,48	1,94	1,75
0,5	0,45	0,66	1,82	1,81
1,0	0,57	0,92	1,87	1,84
1,5	0,71	0,31	1,73	1,88

*açúcares redutores após fermentação.

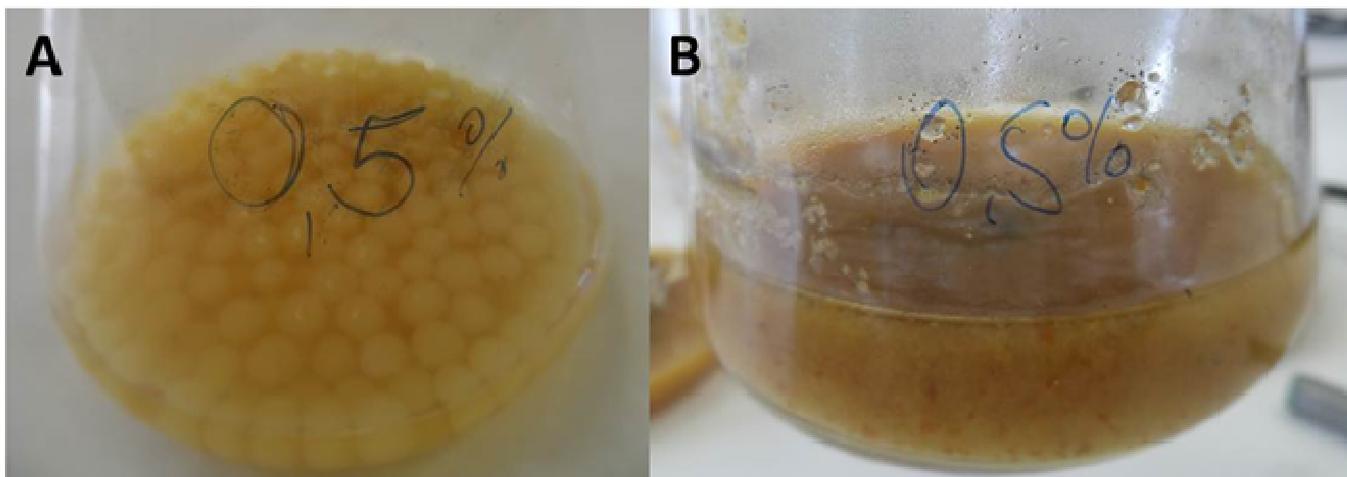
A Tabela 1 mostra que o meio M2 aumentou suas atividades em maiores concentrações de pectina. Isto mostrou que a pectina cítrica serviu como indutora para a produção de PG. Entretanto, comparando os resultados da produção de PG por *Aspergillus aculeatus* URM4953 entre os dois meios pôde-se observar que o meio M1 apresentou maior atividade da PG no controle com relação as atividades do meio M2. De acordo com Fawolea e Odunfa (2003) os fatores ambientais e nutricionais são conhecidos por terem efeitos marcantes sobre a produção de enzimas por micro-organismos. Há, portanto, variações nas condições ótimas para a produção da PG.

Como descrito anteriormente as fermentações foram constituídas por 2% do substrato. Essa concentração foi estipulada com base de testes anteriores (dados não mostrados) que revelaram problemas com a viscosidade dos meios M1 e M2. Da mesma forma as concentrações de pectinas também foram determinadas, pois aumentaram a viscosidade do meio, sendo de difícil dissolução. Por esse motivo mesmo conhecendo a influencia da pectina cítrica na produção de PG no meio M2 não foi possível verificar a influencia da pectina em concentrações maiores.

O meio composto pelo extrato da farinha (M1) apresentou um aspecto límpido sendo possível a fácil separação dos micélios de *Aspergillus aculeatus* URM4953 por filtração (Figura 1A). Diferentemente do meio com substrato (M2), que apresentou uma solução turva e cheia de substratos sólidos suspensos (Figura 1B). O intuito da construção desse meio (M1) foi descobrir se este apresentaria um resultado

satisfatório para produção de PG visando possível aplicação em biorreatores de bancada. Pois presenças de substratos sólidos suspensos dificultam a determinação e reaproveitamento de biomassa, extração da enzima, viscosidade do meio, difusão de oxigênio e o entupimento da tubulação de coleta de amostras.

Figura 1. Produção de poligalacturonase por *Aspergillus aculeatus* URM54953 em fermentação submersa. Meio M1 (A) e M2 (B) com adição de 0,5% de pectina cítrica



CONCLUSÕES

O meio constituído pela extração da pectina presente na farinha da casca do maracujá (M1) mostrou-se promissor para a produção de poligalacturonase. A pectina cítrica diminuiu a produção de PG no meio M1 e favoreceu no meio M2. O meio M1 sem adição de pectina cítrica (controle) apresentou maior atividade da poligalacturonase sendo considerada a melhor condição para produção desta pectinase por *Aspergillus aculeatus* URM4953 em fermentação submersa, pois não houve gastos com adição de pectina cítrica no meio, a extração da enzima foi mais rápida e possível reaproveitamento da biomassa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAWOLE, O.B. e ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 52, p. 223 – 227, 2003.

FONTANA, R. C., SALVADOR, S. e SILVEIRA, M. M. Influence of pectin and glucose on growth and

polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. v. 32, p. 371–377, 2005.

FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo- polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* IN LIQUID MEDIUM. v. 29, n. 04, p. 683–690, 2012.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 215–227, 2001.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; SOARES-JÚNIOR, M. S. Extração de pectina de goiaba desidratada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 119–125, 2010.

PALANIVELU, P. Polygalacturonases: Active site analyses and mechanism of action. *Indian journal of Biotechnology*, v. 5, p. 148–162, 2006.

REHMAN, H. U.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, n. 1, p. 387–391, 2012.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. *LWT - Food Science and Technology*, p. 1–7, 2014.

SOUZA, R. L. A. de et al. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 9, 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, p. 824–829, 2008.