

## Produção de Poligalacturonase por *Aspergillus niger* em Fermentação Semi-Sólida utilizando como Substrato Torta de Canola

Ruann Janser Soares de Castro<sup>1,2</sup>, Adriana Crispim Freitas<sup>1,3</sup>, Millena Aguiar Beserra<sup>1,2</sup>, Janaina Maria Martins Vieira<sup>1,3</sup>, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria Tropical - Laboratório de Bioprocessos  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 CEP: 60511-110 Fortaleza-CE - E-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia de Alimentos  
Caixa Postal 12168 – 60356-000 Fortaleza – CE - E-mail: ruannjanser@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química  
CEP - 60455-760 – Fortaleza – CE, E-mail: adrianacfreitas@yahoo.com.br

### RESUMO

*A produção de enzimas por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular do meio de cultura, umidade, tipo e fonte de carbono e temperatura do cultivo, além de outros fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de poligalacturonase (PG) por Aspergillus niger CCT 0916 em fermentação semi-sólida utilizando torta de canola como substrato, para isso testaram-se parâmetros de cultivo, como adição de água a torta, temperatura de incubação e inóculo inicial. As condições de cultivo que favoreceram a síntese de PG foram: adição de 100mL de água para cada 100g de torta de canola, temperatura de incubação de 30°C e inóculo inicial de  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> com produção máxima de 19,7 U.g<sup>-1</sup> em 72h de fermentação.*

**Palavras-chave:** fermentação semi-sólida, torta de canola, poligalacturonase.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a técnica de fermentação em estado sólido tem recebido uma maior atenção dos pesquisadores, tanto para produção de enzimas, quanto para obtenção de substâncias de interesse da indústria de alimentos, pois tem mostrado que pode ofertar maior produtividade ou produtos com melhores características do que a fermentação submersa. Além disso, há a possibilidade de utilização de substratos de baixo valor agregado, diminuindo assim o custo da produção (ROBINSON e NIGAM, 2003).

Pectinases ou enzimas pectinolíticas são bem conhecidas por sua importância comercial entre as enzimas, e são principalmente produzidas por fermentação semi-sólida. Pectinases detêm uma quota de 25% nas vendas globais de enzimas (JAYANI *et al.*, 2005), e são amplamente utilizadas na indústria de bebidas, devido à sua capacidade de melhorar a prensagem e clarificação de sucos de frutas (SILVA *et al.*, 2005). Além disso, elas são utilizadas no tratamento de frutos e produtos hortícolas, na produção de vinho, na extração do azeite e fermentação de chá e café (CASTILHO *et al.*, 2000, SILVA *et al.*, 2005). Entre as pectinases utilizadas, a poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* é a mais estudada por sua importância comercial (CASTILHO *et al.*, 2000).



O objetivo principal deste trabalho foi estudar os parâmetros de cultivo de *A. niger* CCT 0916 a fim de intensificar a produção de poligalacturonase por fermentação semi-sólida utilizando torta de canola como substrato. Para tal fim, caracterizou-se a torta de canola, verificou-se a influência da adição de diferentes volumes de água ao substrato de fermentação, variou-se a temperatura de incubação e o tamanho do inóculo inicial.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Caracterização da torta de canola e determinações analíticas

A torta de canola foi gentilmente cedida pela empresa Celena Alimentos. O resíduo teve sua composição centesimal determinada, sendo as análises de umidade, cinzas e extrato etéreo realizadas segundo as metodologias descritas em Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985), enquanto a determinação de proteína ocorreu utilizando o método semi-micro de acordo com a metodologia de YEMN e WILLIS (1954). Também foram realizadas determinações de amido e sólidos solúveis totais segundo IAL (1985). A atividade de água nos meios formulados e autoclavados foi medida pelo método do higrômetro de ponto de orvalho em aparelho AQUALAB Decagon modelo CX-2.

A distribuição granulométrica foi feita com 100g do material colocados em conjunto de peneiras acoplada a um agitador mecânico, com 8, 4, 2, 1, 0.5 e 0.1 mesh. O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação ao peso total do material.

#### Microrganismo

O microrganismo empregado foi *A. niger* CCT 0916, previamente selecionado como uma linhagem produtora de poligalacturonase. A linhagem é mantida estocada (-18°C) na coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

#### Preparação dos meios de inoculação

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500mL com 40g de meio de cultivo, baseado em torta de canola umidificada. Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos. O conteúdo foi homogeneizado. Os frascos foram incubados por 96 h e as amostras eram coletadas a cada 24 h.

#### Parâmetros avaliados no processo

Avaliaram-se, nesse trabalho, parâmetros que intensificassem a produção de poligalacturonase (PG). Para tal fim, variou-se o volume inicial de água adicionada ao meio (50, 75, 100, 125 e 150mL), além da temperatura de incubação (25, 30, 35 e 40°C) e concentração inicial de inóculo no meio de cultivo ( $10^4$  a  $10^7$  esporos /g).



### Obtenção do extrato enzimático

A extração do complexo enzimático foi realizada pela adição de 100 mL de solução tampão acetato 200 mM pH 5,0 aos meios fermentados e mantidos a 30°C por 60 minutos. O complexo enzimático foi obtido por filtração com papel qualitativo. A fase líquida resultante foi recolhida e conservada a -18°C em frascos rosqueados para análises.

### Determinação da atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade de PG no extrato enzimático foi baseada no aumento dos grupos redutores formados por ação da enzima e determinada segundo a metodologia de COURI (1993). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 $\mu$ mol de ácido galacturônico por mL por minuto nas condições de reação.

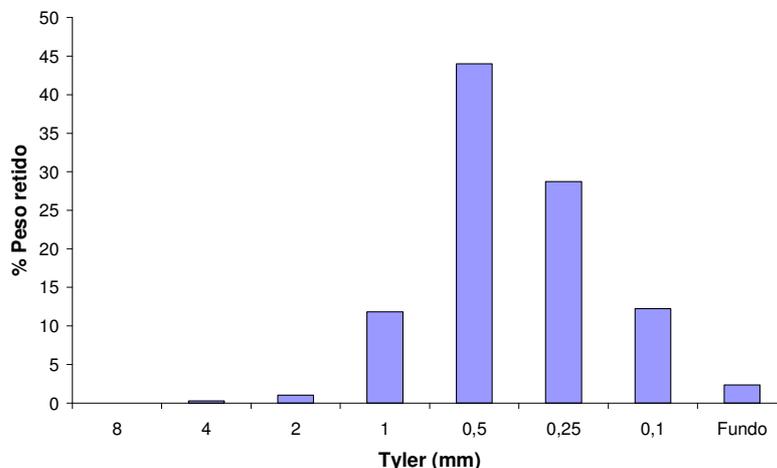
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O alto teor de proteínas e carboidratos na torta de canola viabiliza a sua utilização como meio fermentativo por ser uma ótima fonte de carbono e nitrogênio, nutrientes estes, imprescindíveis ao metabolismo microbiano (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização da torta de canola

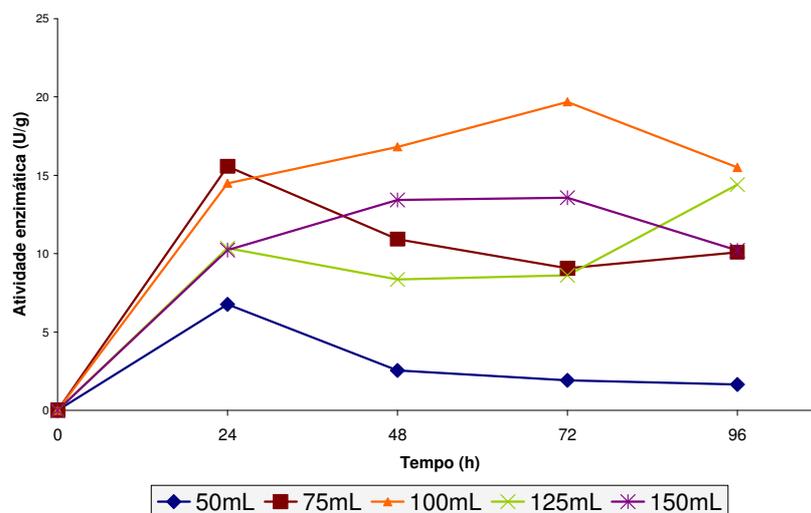
PARÂMETROS AVALIADOS	VALOR DETERMINADO
Umidade (%)	10,96 $\pm$ 0,15
Cinzas (%)	6,37 $\pm$ 0,07
Extrato etéreo (%)	2,02 $\pm$ 0,08
Proteína (%)	40,48 $\pm$ 0,77
Carboidrato total (%)	40,17
Amido (%)	4,46 $\pm$ 0,42
Sólidos solúveis (°Brix)	18,33 $\pm$ 1,44

Quando tratamos de fermentação semi-sólida, a presença de oxigênio é indispensável ao desenvolvimento do microrganismo, portanto o estudo sobre o tamanho das partículas e suas propriedades é de suma importância para conduzir um processo fermentativo em condições ótimas. A distribuição granulométrica (Figura 1) mostrou que 73% das partículas apresentam dimensão entre 0,25 e 0,5mm. SANTOS (2007), afirma que partículas de tamanho reduzido oferecem maior área superficial ao ataque microbiano, mas ao mesmo tempo, tendem a compactar-se facilmente, dificultando a respiração, já partículas de tamanhos maiores promovem maiores espaços interpartículas, facilitando o processo fermentativo. SANTOS (2007), estudando a produção de pectinases por *A. niger*, utilizou bagaço de caju cujas partículas tinham dimensão variando de 0,42mm a 0,84mm. CORREIA (2004), utilizando bagaço de abacaxi como substrato para fermentação semi-sólida trabalhou com partículas que variavam de 0,42mm a 0,59mm.



**Figura 1 – Distribuição granulométrica da torta de canola.**

O nível de umidade de um meio de cultura é um dos fatores que mais influenciam o processo fermentativo, o qual deve ser avaliado criteriosamente de acordo com o microrganismo empregado, o metabólito que se deseja sintetizar e as características físico-químicas do substrato. A síntese de PG por *A. niger* CCT 0916 foi máxima ao adicionar-se 100mL de água para cada 100g de torta de canola, resultando em uma produção de 19,7 U.g<sup>-1</sup> em 72h de fermentação com umidade inicial de 51,8%. Já em níveis baixos de umidade (34,7%), observou-se uma queda de 65,5% na produção (Figura 2). A adição de maiores quantidades de água (125 e 150mL) à matéria-prima também levou a uma redução da síntese enzimática (Figura 2).

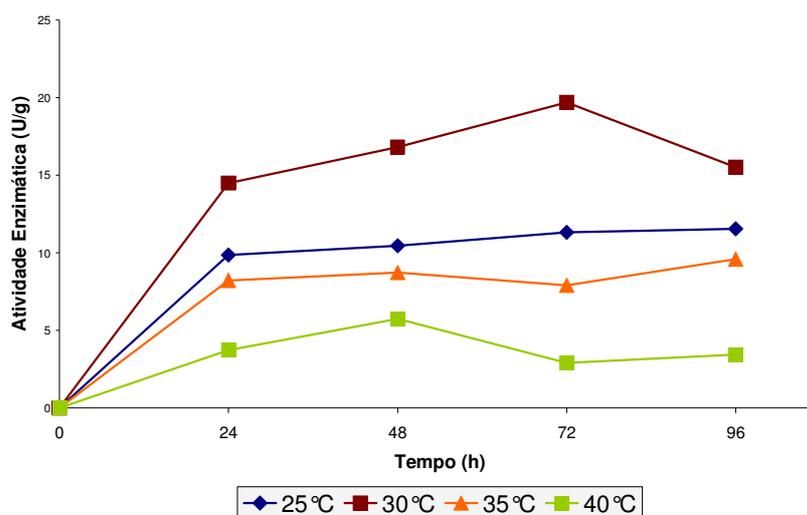


**Figura 2 – Efeito da adição de água no substrato sobre a síntese de PG.**

A literatura relata diferentes teores de umidade inicial para a síntese de pectinases em fermentação semi-sólida empregando *A. niger*. MENEZES *et al.*, (2006), ao estudar a produção de PG utilizando farelo de trigo e resíduo de maracujá, verificou que umidades

iniciais de 40%, prejudicam a síntese da enzima, valor este muito próximo do encontrado no presente trabalho. Os mesmos autores relatam que a umidade inicial que possibilitou a máxima produção de PG foi de 60%. Sendo assim, o volume de 100mL para cada 100g de torta de canola será empregado na próxima etapa do processo fermentativo como condição ótima para produção de PG por *A. niger* CCT 0916.

Em um processo fermentativo utilizando fungos filamentosos, a temperatura de incubação pode influenciar diretamente a germinação de esporos, crescimento e formação de produtos. A temperatura de 30°C foi a que possibilitou maior síntese de PG por *A. niger* CCT 0916, atingindo seu ponto máximo em 72h de fermentação com produção de 19,7 U.g<sup>-1</sup> e produtividade de 0,3 U.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. A produtividade em 24h de fermentação alcançou 0,6 U.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. As temperaturas superiores e inferiores a 30°C dificultaram a síntese de PG pelo fungo. PATIL e DAYANAND (2005), utilizando resíduo de girassol em fermentação semi-sólida e o fungo filamentoso *A. niger* DMF 45, obteve produção máxima de pectinases a temperatura de 34°C. Esses autores afirmam que a temperatura é conhecida por influenciar as taxas metabólicas do organismo envolvido no processo determinando a quantidade do produto final, nesse caso a síntese enzimática.



**Figura 3 – Efeito da temperatura de incubação sobre a síntese de PG.**

Com relação à variação do inóculo, a síntese de PG apresentou um decréscimo ao diminuir-se o tamanho do inóculo. A produção máxima da enzima ocorreu quando foram inoculados 10<sup>7</sup> esporos.g<sup>-1</sup>. USTOK *et al.*, (2006) estudando a produção de PG em fermentação semi-sólida por *A. sojae* ATCC 20235, verificou que inóculos iniciais na ordem de 10<sup>7</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> favoreceram a síntese da enzima, resultado este que condiz com o encontrado no presente trabalho.



### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que: a torta de canola pode ser utilizada em fermentação semi-sólida para produção de PG, e as condições de cultivo que favoreceram a síntese de PG por *A. niger* CCT 0916 foram: adição de 100mL de água para cada 100g de torta de canola, temperatura de incubação de 30°C e inóculo inicial de  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> com produção máxima de 19,7 U.g<sup>-1</sup> em 72h de fermentação.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTILHO, L.R., MEDRONHO, R.A., ALVES, T.L.M., (2000), Production and extraction of pectinases obtained by solid-state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol*, v.71, p. 45–50.

CORREIA, R. T. P. (2004), Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

COURI, S. (1993), Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. *Tese de doutorado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1985), *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. v. 1, 21-45 p.

JAYANI, R.S., SAXENA, S., GUPTA, R., (2005), Microbial pectinolytical enzymes: a review. *Process Biochem.*, v.40, p.2931– 2944.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L. COURI, S. (2006), Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. *Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Exatas e da Terra*, v.25, n.1, p. 15-27.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. (2006), Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, v.97, p.2340–2344.

ROBINSON, T., NIGAM, P. (2003), Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 197-203.

SANTOS, F. M. S. (2007), Estudo da produção de pectinases por fermentação e estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. (2005), Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, v.5, p.859-865.

USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. (2007), Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology*, v.127, p. 322–334.

YEMN, E.W. & WILLIS, A.J. (1954), The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. *The Bioc. J.*, London, 57. 508-14.