

Estudo da Produção de Poligalacturonase por Fermentação em Estado Sólido utilizando Torta de Girassol como Substrato.

Ruann Janser Soares de Castro^{1,2}, Monique Bringel Oliveira Torres^{1,2}, Adriana Crispim Freitas^{1,3}, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto¹

¹Embrapa Agroindústria Tropical - Laboratório de Bioprocessos

Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 CEP: 60511-110 Fortaleza-CE - E-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia de Alimentos

Caixa Postal 12168 – 60356-000 Fortaleza – CE - E-mail: ruannjanser@hotmail.com

³Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química

CEP - 60455-760 – Fortaleza – CE, E-mail: adrianacfreitas@yahoo.com.br

RESUMO

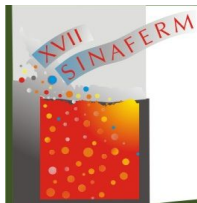
*A produção de enzimas por microrganismos em fermentação semi-sólida é influenciada por diversos fatores de cultivo. O estudo desses fatores torna-se indispensável para a otimização de um processo fermentativo. Avaliaram-se, nesse trabalho, parâmetros que intensificassem a produção de poligalacturonase (PG). Para tal fim, testaram-se diferentes linhagens de *Aspergillus*, o volume inicial de água adicionada ao meio, a temperatura de incubação e concentração inicial de inóculo utilizando torta de girassol como substrato. Os resultados obtidos mostraram que a torta de girassol apresentou características propícias para o processo fermentativo tanto do ponto de vista nutricional quanto estrutural. O microrganismo com maior capacidade de síntese de PG foi *A. niger* CCT 0916. As condições ideais para produção de PG foram: adição de 100mL de água para cada 100g de torta, temperatura de incubação de 30°C e inóculo inicial de 10^7 esporos.g⁻¹ com produção de 38,36 U.g⁻¹.*

Palavras-chave: torta de girassol, *A. niger*, poligalacturonase, fermentação em estado sólido.

INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas são produzidas por muitos microrganismos, destacando-se o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. A poligalacturonase (PG) é a enzima com função hidrolítica principal. Para a maioria dos usos industriais, as poligalacturonases produzidas por fungos provam ser úteis pela alta atividade e atividade ótima em faixa de pH baixa, servindo para grande parte das aplicações em processos com frutas e vegetais (ZHENG e SHETTY, 2000).

Estas enzimas podem ser obtidas tanto em processos submersos (FSm), quanto em processos em estado sólido (FES). Para o caso específico de FES, os suportes ou substratos consistem, basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares (HENDGES, 2006). Dentre as principais características da FES, merecem destaque: baixa quantidade de água disponível, baixo risco de contaminação,



utilização de reatores menores que os utilizados em FSm para a mesma quantidade de substrato, alta produtividade e baixos custos com relação ao substrato utilizado.

A produção de enzimas por microrganismos em FES é influenciada por diversos fatores de cultivo como: o microrganismo selecionado para o processo fermentativo, disponibilidade de água e nutrientes, temperatura, o inóculo inicial aplicado, aeração e presença de substâncias indutoras na produção do metabólito desejado. O estudo desses fatores torna-se indispensável para a otimização de um processo fermentativo. Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de torta de girassol como meio de fermentação semi-sólido para a produção de PG.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima e sua caracterização

A torta de girassol foi gentilmente cedida pela Embrapa Soja. 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). As determinações de amido e sólidos solúveis totais foram realizadas segundo IAL (1985). O resíduo teve sua densidade aparente determinada segundo CORREIA (2004). 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.

Microrganismos e seleção de linhagens

Foram utilizadas sete linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*: *A. niger* CNPAT 001, *A. niger* CCT 0916, *A. niger* CCT 4220, *A. niger* IOC 3883, *A. niger* IOC 4222, *A. niger* IOC 207 e *A. oryzae* IV, estocados na coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

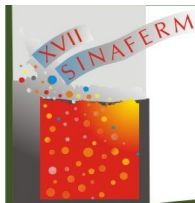
Para a etapa de seleção de linhagens, definiu-se como ponto inicial das fermentações a adição de 100mL de água destilada para cada 100g de torta de girassol, temperatura de incubação de 30°C e inóculo inicial de 10^7 esporos.g⁻¹.

Preparação dos meios de inoculação

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500mL com 40g de meio de cultivo, baseado em torta de girassol 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 horas e as amostras eram coletadas a cada 24 h.

Parâmetros avaliados no processo

Selecionada a linhagem com maior capacidade de síntese de PG, variou-se o volume inicial de água adicionada ao meio (25, 50, 75, 100 e 125mL), além da temperatura de incubação (25, 30 e 35°C) e concentração inicial de inóculo no meio de cultivo (10^4 a 10^7 esporos .g⁻¹).



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 1µmol de ácido galacturônico por mL por minuto nas condições de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Caracterização da torta de girassol

De acordo com os valores obtidos, pode-se observar que a torta de girassol é rica em gordura, proteína e carboidrato (Tabela 1). Uma característica importante a ser destacada é a densidade aparente do resíduo (0,438 g/mL) que revela que a torta de girassol possui partículas que tendem a não compactar-se, gerando espaços vazios que permitem a entrada de oxigênio favorecendo o processo fermentativo.

Tabela 1- Caracterização da torta de girassol

PARÂMETROS AVALIADOS	VALOR DETERMINADO
Umidade (%)	8,0 ± 0,03
Cinzas (%)	4,31 ± 0,28
Extrato etéreo (%)	16,84 ± 0,42
Proteína (%)	24,85 ± 1,86
Carboidrato total (%)	46,0
Amido (%)	4,89 ± 1,38
Sólidos solúveis (°Brix)	23,34 ± 1,44
Densidade aparente (g/mL)	0,438 ± 0,09

Seleção de linhagens

Dentre os microrganismos avaliados verificou-se que a produção de PG não foi detectada nas fermentações realizadas com a linhagem *A. oryzae* IV. A maior atividade de poligalacturonase (38,36 U.g⁻¹) foi observada quando utilizado *A. niger* CCT 0916 (Figura 1). PATIL e DAYANAND (2006) obtiveram 45,9 U.g⁻¹ de PG, utilizando girassol suplementado com glicose e sulfato de amônia por *A. niger*. Dessa etapa em diante, utilizou-se a linhagem de *A. niger* CCT 0916.

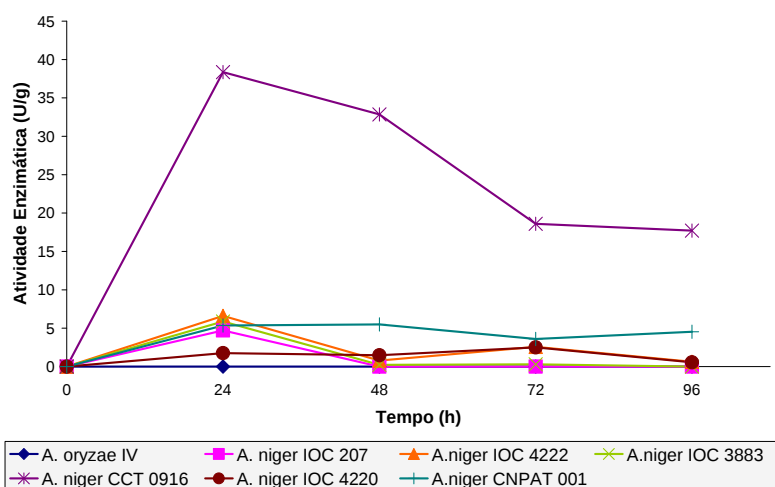
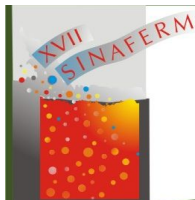


Figura 1 – Produção de poligalacturonase por diferentes linhagens de *Aspergillus*.

Efeito da quantidade inicial de água

A umidade e a A_w aumentaram à medida que a quantidade de água adicionada ao meio aumentava. A umidade inicial da torta de girassol foi de 8,6% e a A_w foi 0,641 (Tabela 2). O aumento do volume de água adicionado promoveu um aumento linear da umidade da torta. Contudo, isto não foi observado para o parâmetro A_w . Cada porção de 25mL de água subsequente adicionada promoveu um impacto menor no aumento de A_w (Tabela 2).

Tabela 2 - A_w e umidade do meio de acordo com os volumes de água adicionados.

ÁGUA (mL)	A_w	UMIDADE (%)
0	0,641 ($\pm$ 0,0007)	8,6 ($\pm$ 0,07)
25	0,945 ($\pm$ 0,0026)	25,5 ($\pm$ 0,28)
50	0,972 ($\pm$ 0,0019)	37,7 ($\pm$ 0,32)
75	0,978 ($\pm$ 0,0005)	45,6 ($\pm$ 0,71)
100	0,986 ($\pm$ 0,0017)	51,8 ($\pm$ 0,51)
125	0,990 ($\pm$ 0,0018)	57,6 ($\pm$ 0,62)

Sabe-se que a quantidade de água é um fator importante que influencia o processo fermentativo em virtude do seu alto grau de interação com as partículas sólidas que fazem parte do meio. SANTOS (2007), ao estudar a produção de PG por *A. niger* CCT 0916 utilizando pedúnculo de caju, observou que em níveis de umidade altos (60%), a síntese de PG praticamente não existiu, fato este também observado no presente trabalho (Figura 2). Ao passo que, em baixos teores de umidade, a produção enzimática também é reduzida porque o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte e afetando o metabolismo microbiano (ACUÑA-ARGUELLES *et al.*, 1994). Portanto níveis intermediários de umidade devem ser estabelecidos para que a síntese enzimática seja favorecida. A melhor condição para a síntese de PG ocorreu no meio formulado com 100mL de água para 100g de substrato ($38,36 \text{ U.g}^{-1}$) com produtividade de $1,6 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nas primeiras 24 horas de fermentação (Figura 2).

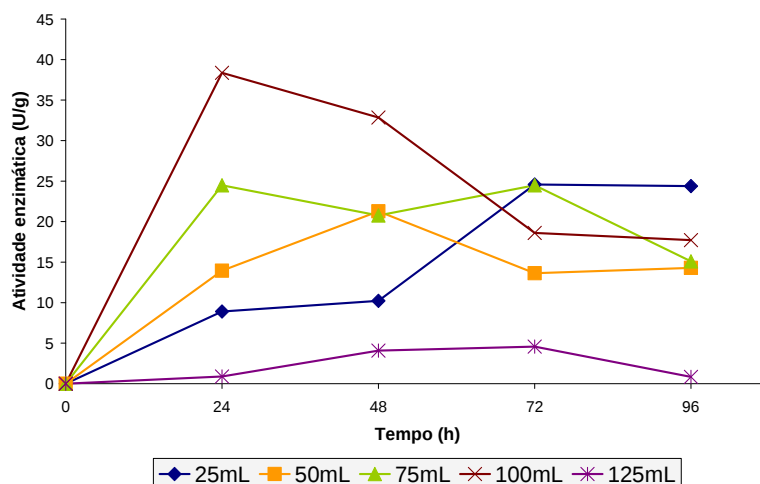


Figura 2 - Efeito da quantidade inicial de água sobre a atividade de PG.

Efeito da temperatura de incubação e do inóculo inicial

Os resultados obtidos nessa etapa mostraram que houve uma perda na produção de PG, tanto com o aumento (35°C), quanto com a diminuição (25°C) da temperatura de incubação, sendo 30°C, a temperatura ideal para a síntese da enzima por *A. niger* CCT 0916, atingindo um máximo de 38,36 U.g⁻¹ de PG em 24h de fermentação (Figura 3). A variação do inóculo também apresentou um impacto negativo na síntese de PG por *A. niger* CCT 0916, observando-se uma queda crescente de atividade ao diminuir-se o inóculo de 10⁷ até 10⁴ esporos.g⁻¹, onde em vários pontos a atividade de PG não foi detectada. Nessa etapa o inóculo inicial que favoreceu a síntese de PG foi 10⁷ esporos.g⁻¹, onde a produção alcançou 38,36 U.g⁻¹ nas primeiras 24h de fermentação. NAIR e DUVNJAK (1990) verificaram que inóculos com alto teor de células aumentaram proporcionalmente a produção da enzima fitase por uma linhagem de *A. ficuum* NRRL 3135, em fermentação semi-sólida, fato este observado para a enzima PG nesse trabalho.

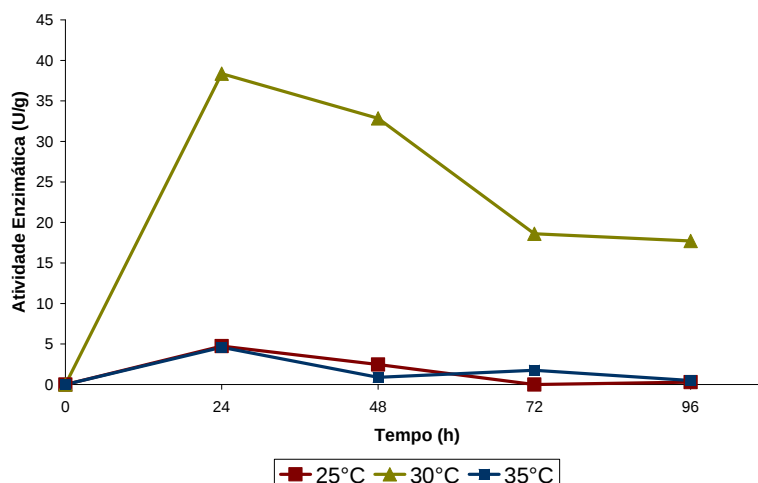
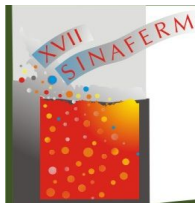


Figura 3 – Efeito da temperatura de incubação sobre a síntese de poliglacturonase



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que: a torta de girassol apresenta características interessantes na utilização em fermentação semi-sólida para produção de PG, a linhagem com maior capacidade de síntese de PG foi *A. niger* CCT 0916, e as condições ideais de cultivo foram: adição de 100mL de água para cada 100g de torta de girassol, temperatura de incubação de 30°C e inóculo inicial de 10^7 esporos.g⁻¹ com produção máxima de 38,36 U.g⁻¹ em 24h de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA-ARGUELLES, M.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. (1994), Effect of water activity on exo-pectinase production by *A. niger* CH4 in solid state fermentation. *Biotechnology letters*, v.16, p. 23-28.

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.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. (2005), Influence of pectin and glucose on growth of polygalactunase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.32, n.8, p. 371–377.

HENDGES, D. H. (2006), Produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em processo em estado sólido em biorreator com dupla superfície. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 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, p. 21-45.

NAIR, V. C.; DUVNJAK (1990), Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 183-188.

PATIL, S.R.; DAYANAND, A. (2006), Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresouce Technology*, v.97, p. 2054-2058.

RODRIGUES, T. H. S., DANTAS, M. A. A., PINTO, G. A. S., GONCALVES, L. R. B. (2007), Tannase Production by Solid State Fermentation of Cashew Apple Bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 675 - 688.

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.

YEMN, E.W. & WILLIS, A.J. (1954). The estimation of carbochhydrate in plant extracts by anthrone. *The Bioc. J.*, v. 57, p. 508-514.

ZHENG Z.; SHETTY K. (2000), Solid state production of poligalacturonase by *Lentinus edodes* using fruits processing wastes. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 825–830.