

OBTENÇÃO DE PECTINASES EM CULTIVO SUBMERSO DE *Aspergillus oryzae* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH

L. MENEGHEL, C. ROSSI, G. PELLEZ REIS, C. REGINATTO,
E. MALVESSI, M. M. SILVEIRA

Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia

E-mail para contato: lmscatharina@ucs.br

RESUMO - A produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* é fortemente influenciada pelo meio e pelos parâmetros de processo. O pH atua sobre a composição do complexo, a atividade e a estabilidade de pectinases durante o cultivo. Neste trabalho, avaliou-se o crescimento celular de *A. oryzae* e a produção de pectinases em cultivos conduzidos sob cinco diferentes condições de controle de pH. Obteve-se maior concentração de biomassa em pH 4,0 constante; porém, nesta condição, a atividade enzimática foi praticamente nula. Verificou-se que a atividade pectinolítica (24U/mL) é preservada quando o pH é ajustado inicialmente em 4,0 e, após queda natural, mantido em mínimo de 2,7 até o final do cultivo. A mais alta atividade enzimática (43U/mL) foi obtida em cultivo no qual o pH foi mantido constante em 4,0 até 24h e, em seguida, reduzido para 2,7 pela adição de HCl. Os resultados confirmam que o pH afeta decisivamente o cultivo de *A. oryzae* e a sua capacidade de produção de pectinases.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, possuem aplicações em diferentes setores comerciais, em especial na indústria de alimentos, nas etapas de extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos (Reid e Ricard, 2000; Hoondal *et al.*, 2002; Gummadi e Panda, 2003; Busto *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2008; Sandri *et al.*, 2011; Sandri *et al.*, 2013). Estas enzimas degradam as substâncias pécticas que conferem alta viscosidade a polpas e sucos de frutas, facilitando, assim, as etapas de filtração e concentração, aumentando o rendimento global do processo. Uma característica que favorece a aplicação de pectinases fúngicas na indústria de alimentos é o fato de o pH ideal de ação de suas enzimas se aproximar do valor de pH de muitos sucos de frutas, ou seja, na faixa de 3,0 a 5,5 (Ueda *et al.*, 1982).

As pectinases podem ser produzidas por muitas espécies de fungos filamentosos, algumas leveduras e bactérias (Kashyap *et al.*, 2001). As preparações enzimáticas comerciais, no entanto, são geralmente produzidas com fungos filamentosos, especialmente os do gênero *Aspergillus*. Na produção de pectinases por *A. oryzae* em processo submerso, o pH exerce efeito direto sobre os resultados do processo de produção de pectinases. Segundo Ueda *et al.* (1982), o pH influencia tanto a produção quanto a composição do complexo pectinolítico sintetizado por *A. oryzae*. Fawole e Odunfa (2003) e Patil e Dayanand (2006) identificaram que a produção de enzimas pécticas por fungos do gênero *Aspergillus* ocorre em faixa ácida de pH. Malvessi e Silveira (2004) verificaram que o crescimento de *A. oryzae* é favorecido em

valores de pH em torno de 4,0 e que a síntese de poligalacturonases, hidrolases do grupo das pectinases, é aumentada com pH em torno de 3,0. Segundo Fontana *et al.* (2009), também em estudos sobre o cultivo de *A. oryzae*, quando o pH foi controlado em mínimo de 2,7, houve um aumento significativo na produção de poligalacturonases, enquanto que, abaixo deste valor, o metabolismo do microrganismos e a produção das enzimas foram prejudicados.

Desta forma, este trabalho teve o objetivo de avaliar o crescimento celular de *A. oryzae* e a produção de pectinases em cultivos submersos conduzidos sob cinco diferentes condições de controle de pH.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi *A. oryzae* IPT-301, cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo. O meio de cultivo empregado foi o descrito por Meneghel (2013), composto de extrato de farelo de trigo, glicose, pectina, extrato de levedura e sais. Os cultivos foram conduzidos em biorreator de bancada (Tecnal, modelo Tecbio), com 4,0L de meio, frequência de agitadores e fluxo de ar de 480rpm e 0,42vvm, a 28°C, por 160h. O indutor enzimático – pectina cítrica – foi adicionado ao meio somente após 24h de cultivo e o pH foi controlado nos valores desejados com NaOH 2,5M e HCl 2,0M.

Os cultivos foram realizados em duplicata, sob cinco diferentes condições, durante os seguintes ensaios, com adição de pectina em 24h de processo:

- T1 – pH mantido constante em 4,0;
- T2 – pH mantido constante em 2,7;
- T3 – pH inicial de 4,0 e, após a queda natural, controlado em mínimo de 2,7;
- T4 – pH inicial 4,0 e, após a queda natural, mantido em 2,7 até o final do cultivo;
- T5 – pH inicial 4,0 mantido constante até 24h, em seguida reduzido para 2,7, pela adição de HCl, e controlado até o final do cultivo.

O crescimento celular foi avaliado por gravimetria e os açúcares redutores totais (ART), pelo método descrito por Bitmann (1974), que prevê a hidrólise ácida, adaptado para amostras isentas de sólidos em suspensão. O método para determinação de ART não sofre a influência da pectina.

A atividade de pectinases totais foi avaliada pelo método descrito por Malvessi (2000). Este método é baseado na medida da redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina a 0,63% (m/v) submetida à ação de enzimas pectinolíticas que rompem as ligações glicosídicas internas da cadeia de ácido poligalacturônico.

A velocidade específica de crescimento celular (μ_X) foi determinada a partir das concentrações celulares medidas nas amostras, durante a fase exponencial do cultivo.

O fator de produção específica ($Y_{P/X}$) foi calculado a partir dos máximos valores de atividade enzimática (P_{max}) e concentração de biomassa (X_{max}) obtidos no cultivo.

Os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$) foram calculados a partir dos máximos valores de atividade enzimática (P_{max}) e concentração de

biomassa (X_{\max}) obtidos no cultivo, e da concentração de substrato consumido até o tempo em que ocorreram os picos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo do efeito do pH sobre o cultivo de *A. oryzae* IPT-301 foi conduzido com base em ensaios prévios (dados não mostrados), em que 4,0 foi o valor inicial que proporcionou maior obtenção de biomassa, assim como nos estudos de Malvessi & Silveira (2004) e Fontana & Silveira (2012).

A pectina cítrica, indutor enzimático de pectinases, foi adicionada ao cultivo após a fase de intenso crescimento celular, na tentativa de facilitar o fornecimento de oxigênio para o microrganismo durante este período. Além disso, a alta viscosidade conferida ao meio do cultivo pela pectina dificulta o controle dos parâmetros de processo, podendo influenciar o estudo do pH.

Os resultados gerais dos cultivos, para todas as condições de pH avaliadas são resumidos na Tabela 1. O crescimento celular e a produção de pectinases foram favorecidos no Ensaio T5. Já os fatores de produção específica ($Y_{P/X}$) obtidos nos ensaios T2, T3, T4 e T5 foram similares. Estes resultados indicam que, nesta condição, maiores concentrações de biomassa resultaram em altas atividades de pectinases. A condição avaliada no Ensaio T1 (pH 4,0 constante) se mostrou favorável ao crescimento celular no entanto, ensaios anteriores demonstraram que os títulos enzimáticos obtidos foram praticamente nulos.

Tabela 1 – Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada, sob diferentes condições de pH

	T1	T2	T3	T4	T5
X_{\max} (g/L)	4,6	3,3	3,8	3,6	6,3
$t_{X,\max}$ (h)	28	27	24	24	36
$\mu_{X,\max}$ (h^{-1})	0,16	0,15	0,16	0,16	0,18
$t_{\mu X,\max}$ (h)	13	15	17	17	19
S_{cons} (g/L)	11,8	10,0	10,8	10,2	10,8
P_{\max} (U/mL)	n.d.	20	24	24	43
$t_{P,\max}$ (h)	n.d.	153	115	72	140
$Y_{P/X}$ (U/mg)	n.d.	6,06	6,32	6,67	6,82
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,39	0,33	0,35	0,35	0,58
$Y_{P/S}$ (U/mg)	n.d.	2,00	2,22	2,35	3,98
p_v (U/mL/h)	n.d.	0,13	0,21	0,33	0,31
pH_{min}	4,0	2,7	2,7	2,7	2,7
pH_{final}	4,0	2,7	7,2	2,7	2,7

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; $\mu_{X,\max}$ – máxima velocidade específica de crescimento celular; $t_{\mu X,\max}$ – tempo em que ocorreu $\mu_{X,\max}$; S_{cons} – consumo total de ART; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu P_{\max} ; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica; pH_{min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo. n.d. – não determinado.

Na Figura 1, são ilustrados os perfis de crescimento celular e as velocidades específicas em função do tempo nos ensaios T1 a T3. Esta análise inicial foi feita considerando-se as 33 primeiras horas de cultivo, visto que, após este período, o crescimento microbiano nestes ensaios já se encontrava em fase estacionária. Ressalte-se que os Ensaios T4 e T5, no período 0 a 33h, tiveram condições operacionais idênticas às de T3 e T1, respectivamente.

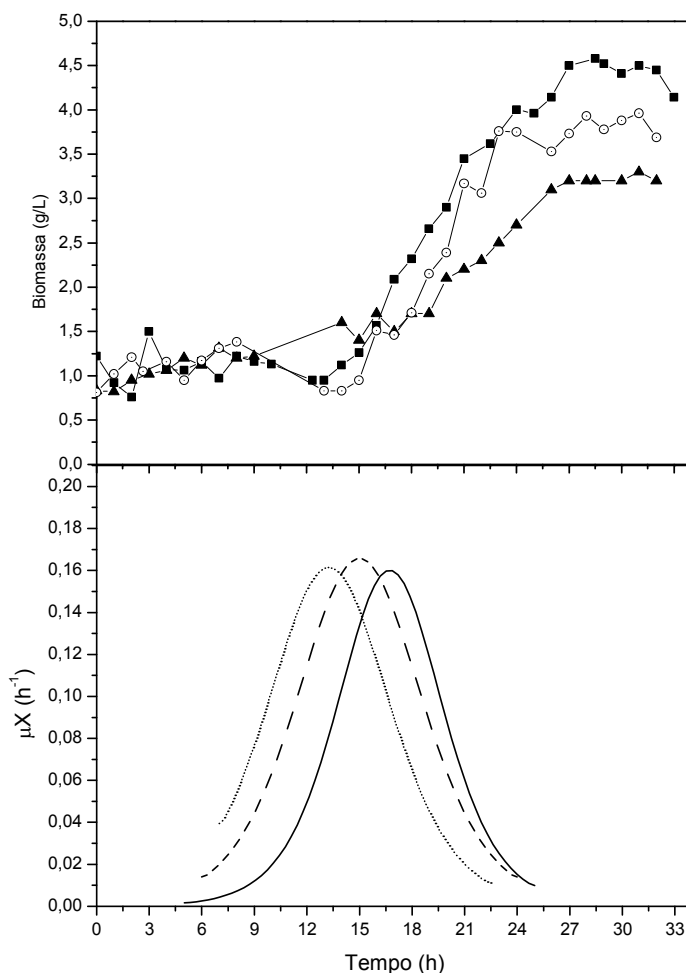


Figura 1 – Variação da concentração de biomassa e da velocidade específica de crescimento obtidos em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada em diferentes condições de pH: (■, ...) T1: pH mantido constante em 4,0; (▲, —) T2: pH mantido constante em 2,7; (○, ---) T3: pH inicial 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7.

Verificou-se que o controle do pH em 4,0 (Ensaio T1) favoreceu o crescimento celular, proporcionando a obtenção de maiores títulos de biomassa em relação às demais condições testadas. Os perfis de velocidade específica de crescimento (μ_X) apresentaram comportamento similar, com valores de $\mu_{X,max}$ muito próximos; porém, estes picos foram alcançados em tempos diferentes de processo para cada condição, sugerindo que a adaptação do microrganismo a cada condição de pH ocorre de forma diferente. No Ensaio T1, o valor de $\mu_{X,max}$ foi atingido em menor tempo de cultivo (13h), em razão do favorecimento do

crescimento celular neste pH. Por outro lado, no Ensaio T2, em pH 2,7 constante, o pico de μ_X ocorreu mais tarde, alcançando-se menor concentração de biomassa.

Verifica-se que o pH afeta diretamente o crescimento celular de *A. oryzae*, sendo que no ensaio mantido em pH 2,7 constante, T2, foi o que apresentou menor concentração final de biomassa.

O estudo do efeito do pH sobre a produção e a atividade de pectinases obtidas em cultivo de *A. oryzae* foi realizado utilizando as condições apresentadas para os ensaios T1 a T5. Os perfis de pH e atividade de pectinases para os cultivos estão apresentados na Figura 2. Nestes ensaios, avaliou-se o cultivo até 160h.

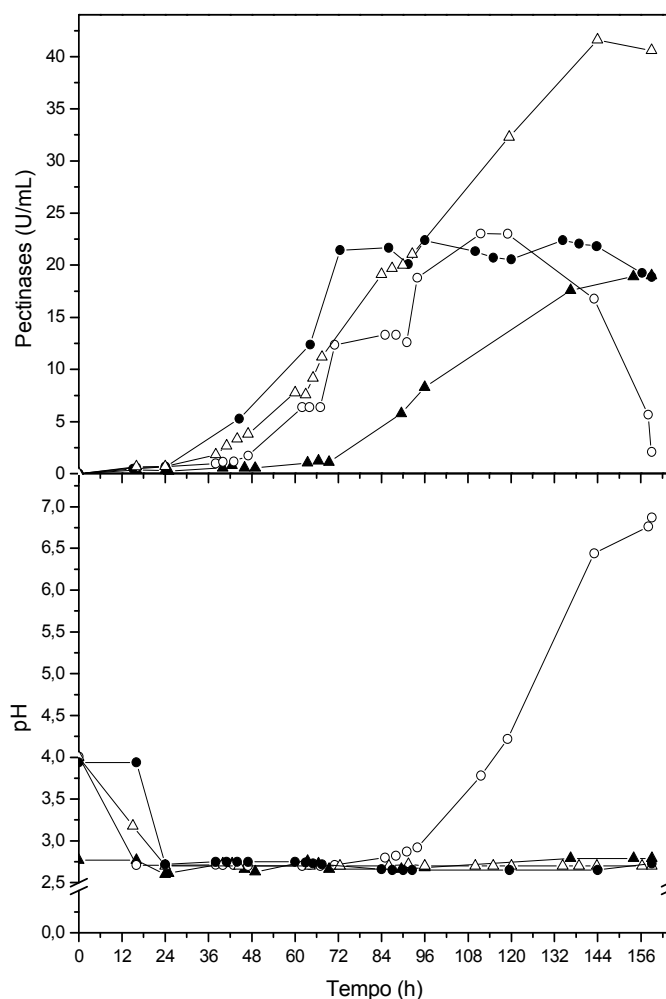


Figura 2 - Variação da atividade de pectinases e do pH em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada, sob diferentes condições de pH: (▲) T2 – pH mantido constante em 2,7; (○) T3 – pH inicial 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7, (●) T4 – pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7, até o final do cultivo; (Δ) T5 – pH inicial 4,0 mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

Conforme discutido anteriormente, a condição de pH do Ensaio T1 (pH 4,0 constante), apesar de favorecer o crescimento celular, não permitiu a obtenção de atividade enzimática em ensaios anteriores; portanto, não será considerada nesta análise. Contudo, o Ensaio T2 (pH 2,7 constante), apesar de proporcionar baixos valores de concentração de biomassa em relação às demais condições testadas, permitiu a obtenção de atividade pectinolítica semelhante às dos Ensaios T3 e T4, porém este valor foi atingido apenas em cerca de 153h, aproximadamente 38h mais tarde que em T3 e 81h mais tarde que em T4, reduzindo o valor de produtividade volumétrica em T2 (Tabela 1).

Assim como Malvessi & Silveira (2004), Fontana *et al.* (2009) e Fontana & Silveira (2012) já demonstraram que altas produções de pectinases são observadas em meios com valor pH em torno de 3,0, que é desfavorável para o crescimento fúngico, sugerindo que a produção destas enzimas se dá preferencialmente em condições de estresse do microrganismo.

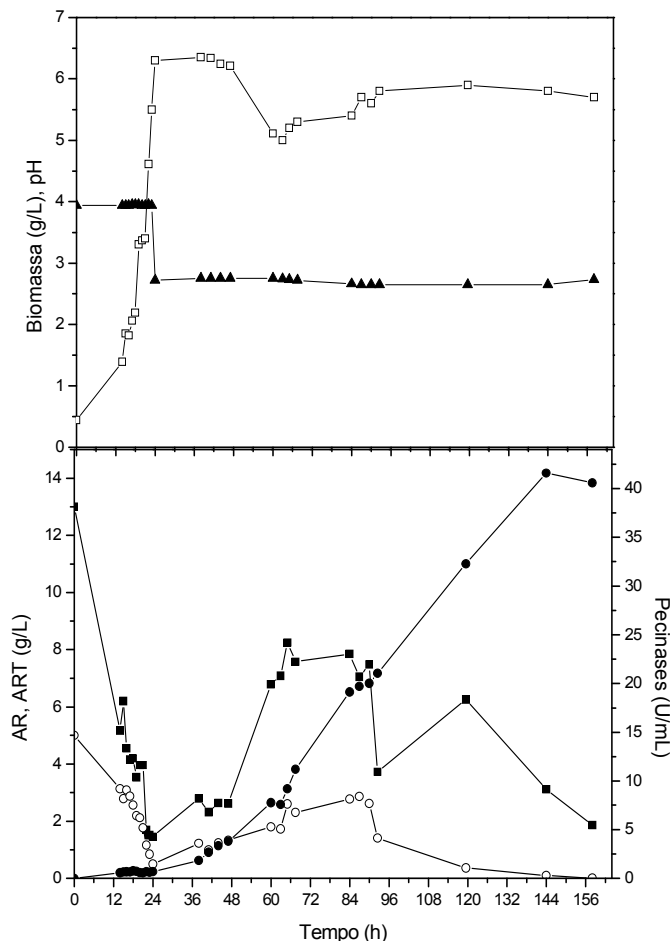


Figura 3 - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares redutores e açúcares redutores totais em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de bancada, no Ensaio T5 - pH ajustado e mantido em 4,0 até 24 horas de processo e queda forçada para 2,7: (□) biomassa, (▲) pH, (○) AR, (■) ART, (●) pectinases.

O Ensaio T5, conduzido em condições de pH, que divide o cultivo em dois momentos – crescimento celular e produção de pectinases –, foi o que resultou nas mais altas atividades enzimáticas e nos maiores valores de $Y_{P/X}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ (Tabela 1). Aparentemente, as condições facilitadas de transferência de oxigênio e mistura, aliadas ao pH ideal para o desenvolvimento microbiano, além de favorecerem o acúmulo de biomassa, mantiveram as células viáveis por mais tempo, tornando-as aptas à produção de pectinases quando forçou-se a queda do pH para 2,7. Os resultados deste ensaio são ilustrados na Figura 3.

Verificou-se queda na concentração de biomassa após 48h de cultivo, mantendo-se, no entanto, no mesmo patamar até 160h. Os perfis cinéticos de AR e ART indicam que as pectinases formadas promoveram a hidrólise da pectina do meio a compostos que foram consumidos pelo fungo, mesmo em fase estacionária. Esta afirmação está baseada no fato de o método utilizado para determinação de ART não contabilizar a pectina presente no meio e nos valores de concentração de ácido galacturônico determinados em alguns tempos de cultivo (dados não mostrados). Este composto é o principal monômero da cadeia de pectina e sua presença no meio está diretamente associada à atividade hidrolítica das pectinases.

4. CONCLUSÕES

Os resultados confirmam que o pH afeta decisivamente o cultivo de *A. oryzae* e a sua capacidade de produção de pectinases. A análise dos resultados permite concluir que em cultivo no qual o pH foi mantido constante em 4,0 até 24h e, em seguida, reduzido para 2,7 pela adição de HCl, foram obtidos maiores valores de concentração celular e de atividade enzimática.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES, à FAPERGS e à UCS pelo apoio na realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BITTMAN, R. Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. *J. Chem. Education*. v. 51, p. 49, 1974.
- BUSTO, M.D.; GARCÍA-TRAMONTÍN, K.E.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresour. Technol.* v. 97, p. 1477-1483, 2006.
- FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *Int. Biodeter. Biodegr.* v. 52, p. 223-227, 2003.
- FONTANA, R.C.; POLIDORO, T.A.; SILVEIRA, M.M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour. Technol.* v. 100, p. 4493-4498, 2009.
- 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. *Braz. J. Chem. Eng.* v. 29, p. 683-690, 2012.

GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. *Process Biochem.* v. 38, p. 987-996, 2003.

HOONDAL, G.S.; TEWARI, R.P.; DAHIYA, N. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biot.* v. 59, p. 409-418, 2002.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* v. 77, p. 215-227, 2001.

MALVESSI, E. Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. *Dissertação de mestrado*. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2000.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol Technol.* v. 47, p. 693-702, 2004.

MENEGHEL, L. Avaliação da produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso. *Dissertação de mestrado*. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2013.

OLIVIER, M.N.; CERUTTI, E.C.; TOMIM, G.C.; FREITAS, M.B.; ROTILI, M.C.C.; GREGÓRIO, N.P. Aplicação da enzima pectinase na vinificação. *Arq. Ciência Saúde Unipar.* v. 12, p. 133-138, 2008.

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

REID, I.; RICARD, M. Pectinase in paper making, solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme Microb. Technol.* v. 12, p. 115-123, 2000.

SANDRI, I.G.; FONTANA, R.C.; BARFKNECHT, D.M.; SILVEIRA, M.M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Sci. Technol.* v. 44, p. 2217-2222, 2011.

SANDRI, I.G.; LORENZONI, C.M.T.; FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Sci. Technol.* v. 51, p. 469-475, 2013.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. *J. Appl. Biochem.* v. 4, p. 524-532, 1982.