

CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO PECTINOLÍTICO PRODUZIDO POR *Aspergillus oryzae* IPT-301

C. ROSSI¹, A. POZZA¹, F. NEGRI¹, C. REGINATTO¹, L. MENEGHEL¹,
E. MALVESSI¹ e M. M. SILVEIRA¹

¹Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia
E-mail para contato: crossi5@ucs.br

RESUMO – Pectinases são enzimas hidrolíticas largamente utilizadas na indústria, especialmente na produção de vinhos e sucos de frutas. A ação das pectinases obtidas com fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae*, é fortemente influenciada por parâmetros como a concentração de substrato, o pH e a temperatura. Os três parâmetros interferem na velocidade de reação, enquanto os dois últimos atuam diretamente sobre a estabilidade do complexo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um extrato pectinolítico produzido por *A. oryzae* IPT-301 em processo submerso, com respeito à temperatura, ao pH e à concentração de substrato, avaliar a sua termoestabilidade e determinar as suas constantes cinéticas. A atividade total de pectinases (TPA) apresentou aumento gradativo a partir de pH 2,5 e foi máxima em 4,0. Para as temperaturas testadas, houve incremento da TPA até 50 °C, chegando à redução de cerca de 90 % da atividade a 60 °C. Após 150 minutos a 50 °C, cerca de 37 % da TPA inicial foi mantida e obteve-se $t_{1/2}$ de 108 minutos. A cinética enzimática se ajustou ao modelo de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,927$) e os valores de $K_m = 0,93$ mg/mL e $V_m = 31,6$ U/mL foram determinados. O baixo valor de K_m , inferior ao encontrado na literatura (1,42 mg/mL), indica a alta afinidade da enzima ao substrato. As pectinases produzidas possuem características semelhantes às das preparações comerciais, sugerindo a possibilidade de seu uso no desenvolvimento de formulações enzimáticas para a indústria.

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas vem ganhando espaço em processos industriais, principalmente no ramo alimentício, uma vez que são catalisadores altamente específicos para seus substratos. Quando comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas contribuem para processos capazes de gerar produtos de qualidade por tecnologias limpas. Ainda assim, apenas uma pequena variedade de enzimas é utilizada em grande escala na indústria de alimentos, incluindo-se neste grupo as pectinases, enzimas de uso consagrado nesse setor (Bon, *et al.*, 2008). As enzimas pectinolíticas são capazes de degradar substâncias pécicas que conferem alta viscosidade e turbidez a sucos de frutas e vinhos, facilitando as etapas de filtração e concentração e aumentando o rendimento global do processo. As pectinases também são aplicadas em outros setores industriais: têxtil, processamento de café, extração de óleos vegetais e tratamento de águas residuárias (Jayani *et al.* 2005; Uenojo e Pastore, 2007). As pectinases podem ser obtidas por microrganismos, tanto em cultivo submerso como em estado

sólido, sendo que quase todas as preparações comerciais pectinolíticas são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Jayani *et al.* 2005).

A atividade catalítica das enzimas é influenciada por fatores como concentração enzimática, concentração do substrato, pH e temperatura. Todos estes fatores têm ação sobre a atividade enzimática, sendo que o pH e a temperatura influem ainda na estabilidade do complexo (Uenojo e Pastore, 2007). 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, em geral, do valor de pH de muitos sucos de frutas, ou seja, na faixa de 3,0 a 5,5 (Ueda *et al.*, 1982). Com relação à temperatura Jayani *et al.* (2005), em estudo de revisão sobre enzimas pectinolíticas, identificam que a faixa de temperatura ótima de ação varia de 30 a 50 °C. Mohsen *et al.* (2009) constataram que poligalacturanases, hidrolases do grupo das pectinases, são relativamente instáveis a altas temperaturas e que a perda de atividade é proporcional ao aumento da temperatura, sendo que a 50 °C, há perda de 82 % de atividade após 120 minutos de incubação. Assim, a caracterização das enzimas pectinolíticas com relação à temperatura assume grande importância, uma vez que, segundo Bon *et al.* (2008), temperaturas entre 50 e 60 °C são utilizadas na etapa de maceração da uva para produção de vinho.

A cinética enzimática das pectinases, em muitos casos, se ajusta ao modelo de Michaelis–Menten, como já reportado por Mohsen *et al.* (2009), que determinaram valor de K_m de 1,42 mg/mL para o substrato pectina cítrica.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar um extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso, com respeito às faixas ideais de temperatura, pH e concentração de substrato, avaliar a sua termoestabilidade e determinar as constantes cinéticas conforme o modelo mencionado acima.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O extrato pectinolítico testado foi obtido em cultivo submerso de *A. oryzae* IPT –301 em meio contendo extrato de farelo de trigo, glicose, pectina cítrica (gentilmente cedida pela CPKelco, Brasil), extrato de levedura e sais (Meneghel *et al.*, 2014). Os cultivos foram conduzidos em biorreator BioFlo/CelliGen 115 (New Brunswick), com 4 L de meio a 28 °C, por 144 h.

A atividade de pectinases totais (TPA) foi determinada pela medida da redução de viscosidade de uma solução 0,63 % (m/v) de pectina em viscosímetro Brookfield modelo LVDV-II, em pH 4,0, a 30 °C, conforme descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi (2000). Uma unidade de pectinase demonstrada na forma de U/mL é definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50 % da viscosidade da solução de pectina, nas condições padronizadas.

As condições de pH em que ocorre a atividade máxima foram determinadas a 30 °C e as temperaturas foram avaliadas em pH 4,0. Os valores de pH testados variaram de 2,5 a 8,0 (em tampão fosfato-citrato) e os de temperatura, de 20 a 60 °C. Os parâmetros cinéticos K_m e V_m da equação de Michaelis-Menten foram determinados a partir das atividades enzimáticas obtidas em reações conduzidas com concentrações de pectina de 0,05 a 0,63 % (m/v). A

termoestabilidade do extrato pectinolítico foi avaliada frente a temperaturas que variaram de 20 a 60 °C em tempos de incubação de 0 a 150 minutos, em pH 4,0.

Os valores das atividades residuais para cada temperatura, nos períodos de tempo definidos, foram plotados e através da linearização da Equação de Arrhenius (Equação 1), calculou-se a constante de inativação da enzima:

$$\ln (A_t/A_0) = - kt \quad (1)$$

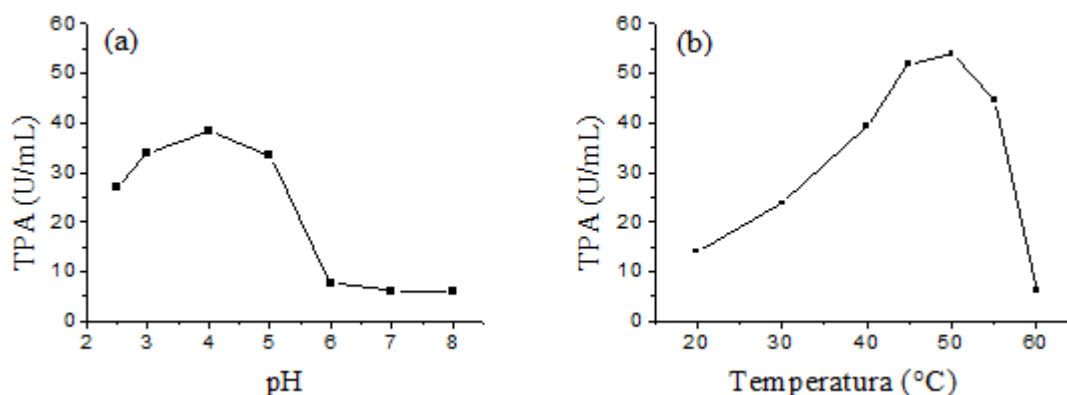
em que A_t é atividade de pectinase no tempo definido (U/mL) e A_0 é a atividade de pectinase no início do ensaio (U/mL), k é a constante de inativação e t é o tempo em minutos. A partir do valor obtido para k , o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pôde ser calculado através da Equação 2:

$$t_{1/2} = \ln(2)/k \quad (2)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, são mostradas as variações da atividade total de pectinases (TPA) em função do pH (a) e da temperatura (b) de reação.

Figura 1 - Atividade de pectinases totais (TPA) em função do pH (a); e da temperatura (b).



Observou-se aumento gradativo nos valores de TPA a partir de pH 2,5 atingindo máximo em pH 4,0. Quando submetido a condições de pH superiores a 5,0, houve declínio acentuado na atividade enzimática, sendo que apenas 20 % de TPA foi mantida, corroborando resultados obtidos por Malvessi e Silveira (2004), Fontana *et al.* (2009) e Sandri *et al.* (2013)

Entre as temperaturas testadas, houve aumento da TPA com o aumento da temperatura até 50 °C, sendo que para temperaturas maiores a ação da enzima foi drasticamente afetada, chegando à redução de cerca de 90 % a 60 °C, o que pode ser indicativo de desnaturação da enzima. Kashyap *et al.* (2001) também descreveram que pectinases produzidas por *A. niger* possuem atividade máxima em torno de 50 °C, assim como Al-Najada (2014) utilizando extrato de *A. awamori*.

Além disso, os resultados obtidos para o pico de atividade pectinolítica do extrato de *A. oryzae* foram semelhantes às características de preparações comerciais de enzimas pectinolíticas, conforme mostrado na Tabela 1.

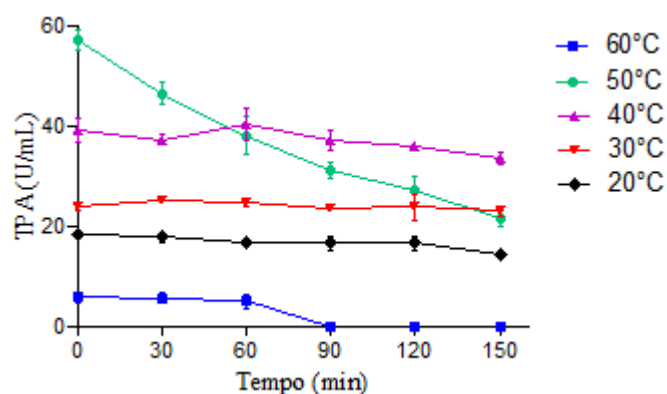
Tabela 1 – pH e temperatura das máximas atividades de pectinases obtidas para o extrato de *A. oryzae* e faixas de aplicação de preparações enzimáticas comerciais.

	Extrato de <i>A. oryzae</i>	Pectinex® Ultra* ¹	Novozym® 33095* ²
pH	4,0	3,0 a 4,2	3,5 a 4,2
Temperatura (°C)	50	10 a 60	15 a 60

* Dados disponíveis em: ¹<http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Pectinex%20Ultra%20AFP%20App%20Sheet.pdf>; e ²http://winequip.com.au/wp-content/uploads/2015/01/Novozym-33095_application-sheet_Jul08.pdf.

Na Figura 2, são mostrados os resultados de termoestabilidade do extrato pectinolítico de *A. oryzae*. Constatou-se que os valores de TPA se mantiveram estáveis até 150 minutos de incubação a 20, 30 e 40 °C, de forma semelhante à descrita por Sandri *et al.* (2011) para extratos de *A. niger* (cultivo sólido) e *A. fumigatus* (cultivo submerso). Já Poletto *et al.* (2014) verificaram que o extrato pectinolítico produzido por *A. niger* em meio sólido mostrou-se estável apenas nas temperaturas de 20 e 30 °C.

Figura 2 - Estabilidade térmica expressa em TPA, em função do tempo de incubação.



Mohsen *et al.* (2009) determinaram que a 50 °C, apenas 18 % de atividade é mantida após 120 minutos de incubação. No entanto, neste estudo, a 50 °C, cerca de 37 % da TPA (23 U/mL) foi mantida após 150 minutos de incubação. A 30 °C, apesar da alta estabilidade, a atividade enzimática não ultrapassou 22 U/mL.

Na Tabela 2, são mostrados os valores das constantes de inativação (k) e dos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), calculados para cada temperatura em que o extrato foi incubado, e a atividade relativa obtida após 150 minutos. Como esperado, a constante de inativação aumenta com o aumento da temperatura e o tempo de meia vida, por sua vez, diminui. Considerando o relato de Sandri *et al.* (2011), de que o tratamento enzimático para clarificação de sucos com preparações comerciais ocorre entre 30 e 50 °C de 30 a 60 minutos, o extrato caracterizado neste estudo se enquadra nas condições de utilização industrial.

A cinética enzimática ajustou-se ao modelo de Michaelis–Menten, com correlação (R^2) de 0,927, e os valores de $K_m = 0,93$ mg/mL (0,093 % m/v) e $V_m = 31,6$ U/mL foram

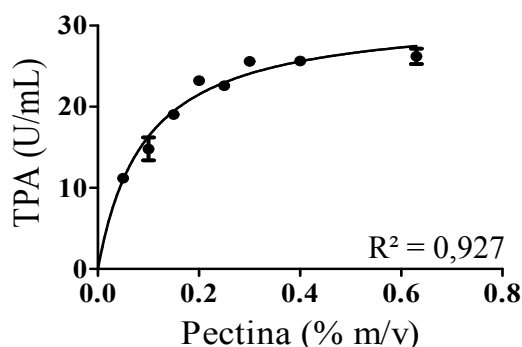
determinados (Figura 3). O baixo valor de K_m , inferior ao encontrado por Mohsen *et al.* (2009), 1,42 mg/mL, indica a alta afinidade entre as enzimas produzidas e o substrato pectina cítrica. Os estudos de Dinu (2001), Rombouts e Pilnik (1980) e Al-Najada (2014) reportam valores de K_m de 0,94, 0,54 e 1,5 mg/mL respectivamente, utilizando, no entanto, ácido poligalacturônico como substrato, que é considerado de mais fácil degradabilidade se comparado à pectina (Jayani *et al.* 2005). Al-Najada (2014) também apresenta valores de máxima velocidade da reação (V_m) de 15,4 U/mL, que é praticamente a metade da velocidade máxima obtida no presente estudo.

Tabela 2 – Atividade relativa (150 minutos), constantes de inativação e tempo de meia vida do extrato pectinolítico produzido por *A. oryzae* em processo submerso.

Temperatura (°C)	Atividade relativa (%)	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	R ²
20	79	0,0016	433	0,946
30	96	0,0008	866	0,925
40	85	0,0009	770	0,848
50	37	0,0064	108	0,996
60	0	0,0149	47	0,802

k – constante de inativação; t_{1/2} – tempo de meia vida; R² - coeficiente de correlação do ajuste da linearização da Equação de Arrhenius.

Figura 3 - Variação de (•) atividade de pectinases com diferentes concentrações de substrato e (—) valores previstos pela equação de Michaelis-Menten.



4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho apresentam informações importantes com relação às características das pectinases produzidas por *A. oryzae* IPT-301 em cultivo submerso, confirmando o seu potencial de utilização em formulações aplicáveis à indústria de alimentos, uma vez que possuem características semelhantes às observadas em preparações comerciais.

5. REFERÊNCIAS

AL-NAJADA, A. R. Partial purification and physicochemical characterization of polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Life Scienc. Journ.*, v. 11(5), p. 253-259, 2014.

- BON, E. P. S.; COSTA, R. B.; SILVA, M. V. A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; FREITAS, S.P.; FERRARA, M.A. *Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- DINU, D. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Roum. Biotechnol.*, v. 6(5), p. 397-402, 2001.
- FONTANA, R. C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Comparision of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 4493-4498, 2009.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- 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.
- MAIORANO, A. E. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. *Tese de doutorado*. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1990.
- MALVESSI, E. Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. *Dissertação de Mestrado*. 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.; REIS, G. P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. *Process Biochem.*, v. 49, p. 1800-1807, 2014.
- MOHSEN, S. M.; BAZARAA, W. A.; DOUKANI, K. Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: 4^o Conference on Recent Technologies in Agriculture. *Anais*, p. 805 – 817. Egito, 2009.
- Novozym® 33095: Application Sheet. Disponível em: <http://winequip.com.au/wp-content/uploads/2015/01/Novozym-33095_application-sheet_Jul08.pdf>. Acesso em: set. 2014.
- Pectinex® Ultra AFP: Application Sheet. Disponível em: <<http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Pectinex%20Ultra%20AFP%20App%20Sheet.pdf>>. Acesso em: set. 2014.
- POLETO, P.; BORSOI, C.; REGINATTO, C.; ZENI, M.; SILVEIRA, M. M. Aplicação de preparação pectinolítica fúngica obtida por cultivo em estado sólido na extração de suco de uva. In: XX COBEQ. *Anais*. Brasil, 2014.
- 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. 459-475, 2013.
- ROMBOUTS, E. M.; PILNIK, W. Pectic Enzymes. In: Rose, A. (Ed). *Economic Microbiology*, v. 5. London: Academic Press, p. 693, 1980.
- UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A. 3. *J. Appl. Biochem.*, v. 4, p. 524-532, 1982.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. *Pectinases: aplicações industriais e perspectivas*. Quím. Nova, 2007.