

PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE USANDO *Bacillus* sp POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Marcela Vicente Vieira Andrade

Doutoranda em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos/UFRJ/RJ
Marcelandrade14@yahoo.com.br

Andréia Boechat Delatorre

Doutoranda em Produção Vegetal pela UENF-RJ

Silvania Alves Ladeira

Doutoranda em Produção Vegetal pela UENF-RJ

Vanessa Vicente Vieira Andrade

Aluna de Iniciação Científica pela UENF-RJ

Meire Lélis Leal Martins

PhD em Biologia Molecular e Microbiologia pela University of Sheffield-Inglaterra

RESUMO

Poligalacturonases pertencem à família das pectinases, enzimas de grande demanda na indústria de alimentos, devido a suas mais diversas aplicações. Neste contexto, este trabalho teve como foco estudar a produção de poligalacturonase usando uma linhagem termofílica de *Bacillus* sp por fermentação submersa. O meio de cultura foi preparado usando 0,5% pectina cítrica/ pectina de maçã suplementado com água de maceração de milho, cuja concentração foi variada de acordo com os seguintes valores: 0,2; 0,3 e 0,5%. Os experimentos foram conduzidos em escala de bancada, usando um Shaker rotatório à temperatura de 50°C, pH constante de 7,5 e 150 rpm. A produção da enzima foi avaliada em função da atividade enzimática d extratos brutos do caldo de fermentação ao final do processo. Conseqüentemente, os resultados revelaram que a produção de poligalacturonase atingiu seus valores máximos às 36 horas de fermentação, alcançando níveis de 39 U/mL, sugerindo que a produção desta enzima foi parcialmente associada ao crescimento.

Palavra chave: poligalacturonase, *Bacillus* sp., termofílico, fermentação submersa

ABSTRACT

Poligalacturonases belong to the pectinases family, which presents several applications at industrial scale. In this context, the poligalacturonase production using a thermophilic lineage of *Bacillus* sp for fermentation submerged was studied. The culture medium was prepared using 0,5% citric pectin/ pectin of apple supplemented with corn steep liquor, whose concentration was varied according to the following values: 0.2, 0.3 and 0.5%. The experiments were carried out at laboratory scale, using Shaker flask, at 50°C, 150 rpm and constant pH of 7.5. The enzyme production was measured as a function of the enzymatic activity of the fermentation broth extracts. Consequently, the results revealed that the culture medium affected both, cell growth and enzyme production. The poligalacturonase production reached its maximum value at the 36 hours of fermentation, reaching levels of 39 U/mL, suggesting that the production of this enzyme was partially associated to the growth.

Keyword: polygalacturonase, *Bacillus* sp., thermophilic, submerged fermentation

1. Introdução

Pectinases foram às primeiras enzimas a serem usadas na indústria. Sua aplicação comercial foi observada em 1930 para a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas na década de 1960, a composição química dos tecidos de plantas ficou esclarecida e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são hoje as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (Carvalho, 2007).

As pectinases são responsáveis pela degradação de pectina, uma molécula complexa, constituída basicamente por polissacarídeos estruturais parcialmente metoxilados, os quais estão presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Atualmente estas enzimas possuem várias aplicações biotecnológicas sendo consideradas como destaque no setor industrial. Assim, encontram aplicação na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, na extração de óleos essenciais, na produção de alimentos para recém-nascidos, na fermentação do café e cacau, além de outras, como na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho e o ramie (Malvessi e Silveira, 2004).

Por sua vez, a pectina desmetoxilada é chamada ácido poligalacturônico ou ácido péctico. Microrganismos podem degradar a pectina diretamente, por clivagem em oligômeros metoxilados, ou após desmetoxilação da pectina, ou mesmo, pela ação da enzima pectinaesterease (EC 3.1.1.11). A clivagem direta da pectina ou do ácido poligalacturônico pode ocorrer por hidrólise ou ação transeliminativa (Tardy et al., 1997).

A classificação das enzimas pécticas envolve dois grupos, a saber: a) aquelas que promovem a despolimerização das ligações glicosídicas do polímero péctico por hidrólises (hidrolases) ou por ação transeliminativa (liases), e b) as que promovem a saponificação das substâncias pécticas (pectinaesterases) conforme apresentado na Figura 1. As hidrolases são denominadas poligalacturonases e são subdivididas, quanto ao mecanismo de ação sobre a cadeia de pectato, em endopoligalacturonases (endo-PG) ou poli (α -1,4-D-galacturonato) glicano-hidrolase (EC 3. 2.1.15), as quais produzem uma série de oligogalacturonatos, tais como, mono, di, tri, e os tetragalacturonatos e exopoligalacturonases (exo-PG), classificadas como poli (α -1,4-D-galacturonato) galacturono-hidrolase (EC 3. 2.1.87) que atuam nas extremidades da cadeia de pectato (Sakai et al., 1993).

Comparativamente com outras enzimas, poucos trabalhos têm sido reportados sobre a produção de pectinases por via biotecnológica. Embora seja conhecido que sua produção por microrganismos é influenciada pelas condições de fermentação e em particular pela composição do meio de cultura, certamente a escolha de linhagens apropriadas constitui uma questão importante. Desta forma, destaque deve-se dar a busca por microorganismos altamente produtores, entre os quais, os termofílicos resultam muito atrativos. Quando esses critérios são alcançados, tem-se uma melhor produção enzimática. Neste contexto, nas últimas décadas tem-se observado uma crescente utilização de resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda de encontrar aplicações alternativas destes resíduos visando, não apenas a redução dos custos de produção, como também o desenvolvimento de processos mais amigáveis com o meio ambiente. Assim por exemplo, a água de maceração de milho, gerada como um subproduto da produção de amido de milho, resulta um substrato atrativo para a produção de pectinases por fermentação, que tem sido usada como uma fonte barata de nutrientes microbianos essenciais para uma variedade de propósitos, desde que, constitui uma rica fonte em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (Rivas et al., 2004).

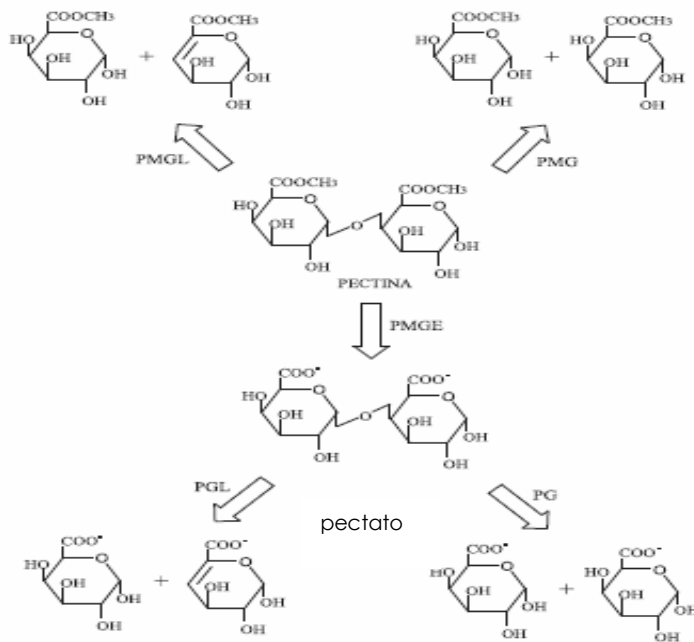


Figura 1. Ilustração do modo de ação enzimática das pectinases sobre uma molécula de pectina (Uenojo et al., 2006): polimetilgalacturonato liase (PMGL); polimetilgalacturonase (PMG); polimetilgalacturonato esterase ou pectina esterase (PMGE); poligalacturonato liase ou pectato liase (PGL) e poligalacturonase (PG).

Este manuscrito, na busca por avaliar novas linhagens de cepas produtoras de pectinases, aborda o estudo da produção de poligalacturonase usando *Bacillus sp* SMIA-2, uma linhagem termofílica isolada de solos da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, e razões diferentes de pectina cítrica/ pectina de maçã suplementado com água de maceração de milho como substratos, visando à obtenção de uma enzima termofílica que possa atender as mais diversas exigências operacionais na indústria de alimentos.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi *Bacillus sp* SMIA-2, uma bactéria termofílica, isolada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ (Nunes e Martins, 2001). O microrganismo foi conservado em meio TSY a 4°C.

2.2. Preparação do meio de cultura e condições de fermentação

O meio de cultura utilizado para a produção da poligalacturonase foi (g/L): pectina (maça ou cítrica) - 0,5%, peptona - 0,1g; KCl - 0,03g, K₂HPO₄ - 0,09g, MgSO₄ - 0,05g, CaCl₂ - 0,03g, ZnO - 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O - 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O - 1,0x 10⁻²; CuCl₂.2H₂O - 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O - 2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O - 2,5x10⁻⁴; H₃BO₃ - 3,0x10⁻⁴ e Na₂MoO₄ - 1,0x10⁻³). O meio foi suplementado individualmente com água de

maceração de milho nas concentrações de 0,2%, 0,3% e 0,5%. O pH final do meio foi ajustado para 7,5 com NaOH e posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Uma vez preparado o meio de cultura, este foi inoculado com uma razão de 10% em relação ao volume total. Os experimentos foram realizados em triplicata, em frascos Erlenmeyers de 250mL, usando um Shaker orbital (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, USA) a 150 rpm e à temperatura de 50°C.

3. Métodos analíticos

3.1. Determinação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi determinado em função da densidade ótica à 600 nm, utilizando um espectrofotômetro Hitachi modelo UVmini -1240 (Kyoto, Japão).

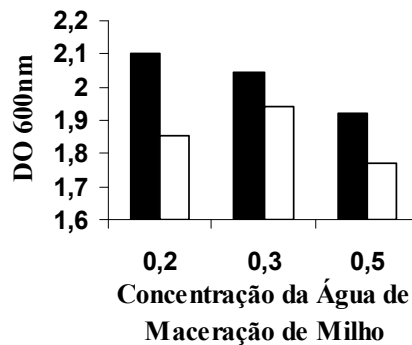
3.2. Ensaio enzimático

O meio de cultura foi centrifugado a 4500 g por 15 min a 4°C em uma centrífuga modelo HERMLE Z 382 K, e o sobrenadante livre de células utilizado para dosagem da atividade da enzima. A atividade da poligalacturonase foi determinada em triplicata nos filtrados da cultura, incubando 0,2 ml da enzima bruta com 0,8 ml de solução de pectina cítrica à 0,5% dissolvida em tampão Glicina-NaOH (50 mM, pH 10,0) a 70 °C por 10 minutos [Soares et al., 1999]. A reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura. Em seguida, esta mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo [Miller, 1959]. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto para o reagente de Miller (DNS), que foi adicionado juntamente com o sobrenadante e a solução de pectina cítrica 0,5%, e esta mistura foi colocada em água em ebulição, como descrito anteriormente. Uma unidade de poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina nas condições do ensaio.

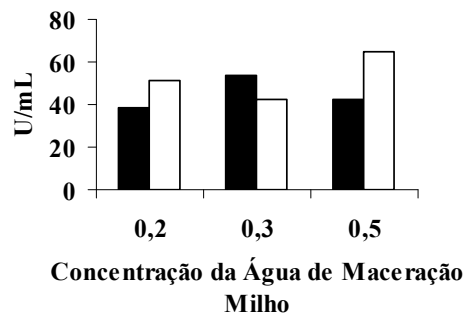
4. Resultados e Discussão

Os resultados (Figura 2) revelaram que as condições de fermentação que favoreceram o crescimento celular foram diferentes das que propiciaram um maior rendimento de poligalacturonase, isto é, foi observado que o aumento da concentração da água de maceração de milho para valores acima de 0,3% não estimularam o crescimento microbiano, quando pectina de maçã foi empregada. Por outro lado, quando a pectina cítrica foi empregada em combinação com a água de maceração de milho, observou-se uma diminuição acentuada do crescimento celular. Desta forma, o crescimento celular apresentou seu valor mais baixo em termos de densidade ótica, enquanto nesta mesma condição, a produção de pectinase atingiu seu valor mais alto em termos de atividade enzimática do extrato bruto (Figura 2a e 2b) mantendo o pH final do caldo de fermentação, aproximadamente constante, na faixa de 9 a 9,5. Provavelmente, isto sugere que se trate de uma enzima, poligalacturonase alcalina. Estas enzimas alcalinas são utilizadas, principalmente, no descolamento e maceramento de fibras e no pré-tratamento de água eliminada da indústria de sucos de frutas. Estas enzimas vêm, majoritariamente, de fontes bacterianas (Kashyap et al., 2001).

a)



b)



c)

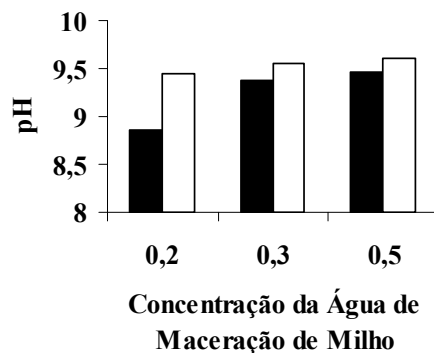


Figura 2. a) Efeito da concentração da Água de Maceração de Milho no crescimento e atividade da poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado a 50° C por 36h. b) Atividade enzimática em meio contendo pectina cítrica e de maçã. c) Influência do pH. Símbolos: ■- pectina cítrica; □- pectina de maçã (ambas com uma concentração constante de 0,5%).

Estes resultados podem ser mais claramente entendidos ao se analisar a cinética de crescimento celular e de formação de produto simultaneamente (Figura 3). Desta forma, o perfil de síntese da enzima mostra que ao cabo das seis primeiras horas de fermentação os valores de atividade enzimática foram da ordem de 20 U/mL. No entanto, os valores máximos foram alcançados após 36 horas de cultura (39 U/mL), quando o microrganismo

já havia atingido a fase de crescimento estacionária. Resultados similares foram reportados por Sharma e Satyanarayana (2006) os quais avaliaram o efeito de diversos parâmetros físico-químicos na produção de pectinase usando *Bacillus pumilus*. Estes autores observaram um incremento linear na produção de pectinase quando a razão C:N foi reduzida ou quando o pH foi incrementado. Desta forma a produção de enzima foi máxima ao cabo de 40 h quando os experimentos foram conduzidos em Shaker.

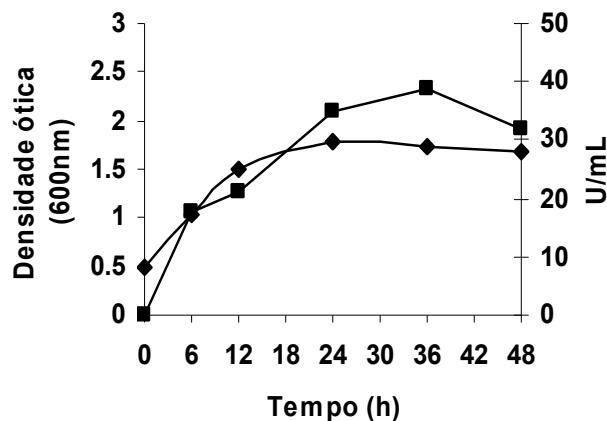


Figura 3. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 em função do tempo de fermentação à temperatura de 50°C e 150 rpm. Símbolos: ◆- Crescimento celular (D.O.600nm) e ■- Atividade enzimática (U/mL).

5. Conclusão

O meio de cultura usado a base de pectina cítrica ou maçã, em combinação com água de maceração de milho influenciaram, ambos, o crescimento celular e conseqüentemente a produção de pectinase. Desta forma, os resultados revelaram que os maiores rendimentos de pectinase produzida foram alcançados quando a razão C:N foi menor. Atualmente, estudos estão sendo conduzidos visando à otimização de condições de fermentação para obter maiores concentrações desta enzima, assim como, para caracterizar do ponto de vista enzimático suas propriedades bioquímicas.

6. Referências

- CARVALHO, S. Pectinases produzidas pelo Agente “G088”: Extração e purificação. Lavras Minas Gerais – Brasil, 2007
- GUPTA, S.; KAPOOR, M.; SHARMA, K. K.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2969-3180, 2007.
- KASHYAP, D. R., VOHARA: p. K., CHOPRA, S., TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial setor: a review, *Bioresource Technology*, 77: p. 215-227, 2001.
- MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and technology*, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, Sept./Oct. 2004.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, 31: p. 426-428, 1959.
- NUNES, A. S.; MARTINS, M.L.L. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 271-275, 2001.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; CARLOS, R. S.; POONAM, N. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162, July 1999.
- RIVAS, B.; MOLDES, A.B.; DOMINGUEZ, J.M.; PARAJÓ, J.C. Development of culture media containing spent yeasts cells of *Dearyomyces hansenii* and steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 97:p. 93-98, 2004.
- SAKAI, T. SAKAMOTO, T., HALLAERT, J., VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39: p. 213-294, 1993.
- SHARMA, D.C. SATYANARAYANA, T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology* 97 727-733, 2006.
- SOARES, M. M. C. N., SILVA, R. GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterizations of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* *Revista de Microbiologia*, 30: p. 299-303, 1999.
- TARDY, F., NASSER, W., ROBERT-BAUDOY, J., HUGOVIEUX-COTTE-PATTAT, N. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 179: p.2503-2511, 1997.
- UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas *Quimica. Nova*, Vol. 30, No. 2, 388-394, 2007.