

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Pectinases Comerciais

Iloir Gaio<sup>1,3</sup>, Carolina E. Demaman Oro<sup>2</sup>, Ilizandra A. Fernandes<sup>2</sup>, Rogério M. Dallago<sup>2</sup>,  
Eunice Valduga<sup>2</sup> e Agenor Furigo Jr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Química  
88040-900 Florianópolis - SC - E-mail: iloirgaio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Departamento de Engenharia de Alimentos  
99709-910 Erechim - RS

<sup>3</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul –Campus Erechim  
99700-000 Erechim - RS

#### RESUMO

*As enzimas são biocatalisadores altamente requisitados, devido às suas propriedades, executando uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação. Para a condução do estudo, foram utilizados dois complexos de pectinases comerciais (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L), onde, para cada complexo enzimático, avaliou-se a enzima pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME). Este estudo teve como objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos: velocidade máxima ( $V_{Max}$ ) de reação e a constante de afinidade ( $K_M$ ). A taxa da reação em diferentes concentrações de substrato é utilizada para obter os parâmetros de Michaelis-Menten ( $V_{Max}$  e  $K_M$ ). Uma faixa de 2,0 a 50,0 g.L<sup>-1</sup> de concentração de pectina cítrica foi estudada. A enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou o menor valor para o  $K_M$ , o que indica uma maior afinidade da enzima para com o substrato. Para o complexo Pectinex® Ultra SP-L, a enzima PME apresentou o maior valor de velocidade máxima ( $V_{Max}$ ).*

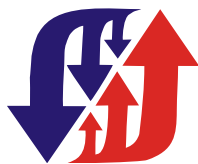
Palavras-chave: Pectinases; Michaelis-Menten; Constante de afinidade;

#### INTRODUÇÃO

Em sistemas vivos, a maioria das reações bioquímicas dá-se em vias metabólicas, que são sequências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Diferentes enzimas catalisam diferentes passos de vias metabólicas, agindo de forma sincronizada de modo a não interromper o fluxo nessas vias. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica em que se insere (PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003).

As pectinases despolimerizam a pectina por hidrólise e transeliminção, bem como por reações de desesterificação, isto é, hidrolisam a cadeia éster entre os grupos carboxila e metil da pectina (DARTORA et al., 2002).

A utilização de enzimas implica na necessidade de controle de variáveis de processo, tais como pH e temperatura ótimas para a sua atuação. Caso não haja um controle das condições operacionais do processo enzimático, a eficiência do processo pode ser prejudicada,



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

levando a perdas de produtividade e economia. Alguns autores afirmam que sem o uso de enzimas, não é possível viabilizar a produção de sumos de alguns frutos e vegetais (HELBIG e LAPERCHE, 2001).

A taxa de reação em diferentes concentrações de substrato (pectina cítrica, para as pectinases) é utilizada para obter os parâmetros de Michaelis-Menten, a velocidade máxima ( $V_{Max}$ ) de reação e a constante de afinidade ( $K_M$ ). Dessa forma, é possível obter a faixa de concentração de substrato onde a enzima atua sem inibições, aprimorando os processos industriais.

Os parâmetros cinéticos das catálises enzimáticas têm sido determinados tradicionalmente pelo uso da velocidade inicial ( $V_0$ ), quando diferentes concentrações de um substrato são usadas (TORRES et al., 2004).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi a determinação dos parâmetros cinéticos ( $V_{Max}$  e  $K_M$ ) de pectinases comerciais.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a condução do estudo, foram utilizadas duas pectinases comerciais (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L), na forma livre, que foram gentilmente cedidas pela empresa LNF Latino Americana Ltda. Ambas são enzimas produzidas por fermentação submersa pelos fungos filamentosos *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger*.

A atividade da pectina liase (PMGL) foi determinada segundo método de Ayers et al. (1966), descrito por Pitt (1988), com algumas modificações, onde determinou-se os produtos insaturados finais da degradação da pectina e o ácido tiobarbitúrico. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorbância a 550 nm, nas condições do ensaio, como pode ser visualizado na Equação 1.

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\Delta_{abs}}{0,01} \quad (1)$$

A atividade de pectinametilsterase (PME) foi determinada segundo Hultin et al. (1966) com modificações (temperatura controlada a  $50^\circ\text{C} \pm 2$ ). A Equação 2 permite calcular a atividade de pectinametilsterase (PME), como pode ser visto abaixo.

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{V_{NaOH} \times M \times 10^3}{t \times e} \quad (2)$$

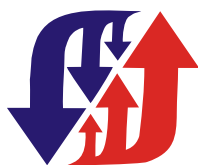
Onde:

**V** = Volume de NaOH gasto em mL;

**M** = Molaridade do NaOH (0,005 M);

**t** = Tempo de reação (30 min);

**e** = Massa de imobilizado em gramas, ou volume de extrato enzimático ou sobrenadante em mL utilizada para realização da medida de atividade.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A partir dos valores de velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) e da concentração do substrato (2,0 a 50 g/L), os coeficientes cinéticos, velocidade máxima ( $V_M$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), foram calculados.

Para determinar  $K_M$  e  $V_M$  utilizou-se o método de Lineweaver-Burk, que consiste em uma linearização (Equação 3) da equação de Henri-Michaelis-Menten (Equação 4).

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m \times [S]} \quad (3)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Uma faixa de 2,0 a 50,0 g.L<sup>-1</sup> de concentração de pectina cítrica foi utilizada para ver qual o efeito que causa na atividade enzimática de PME e PMGL para os dois complexos enzimáticos analisados (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L), podendo assim obter-se os valores de  $K_M$  e  $V_{Max}$ . Utilizou-se os valores de atividade específica de cada enzima para o cálculo. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de  $K_M$  e  $V_{Max}$  obtidos para as enzimas PME e PMGL dos complexos Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L estudados.

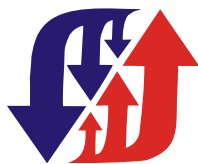
Pectinases comerciais	$K_M$ (mg.mL <sup>-1</sup> )		$V_{Max}$ (U.mL <sup>-1</sup> )	
	PMGL	PME	PMGL	PME
Pectinex® Mash	0,23	1,55	64,10	500,00
Pectinex® Ultra SP-L	0,50	2,27	19,38	666,67

De acordo com a Tabela 1, a enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou o menor valor para o  $K_M$ , o que indica uma maior afinidade da enzima para com o substrato, bem como, maior velocidade máxima ( $V_{Max}$ ), em comparação com o complexo Pectinex® Ultra SP-L.

O valor de  $K_M$  indica a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o  $K_M$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato; logo, a velocidade da reação também será maior (TORRES et al., 2004).

Observa-se um aumento no valor do  $K_M$  para a enzima PME, para os dois complexos em estudo, podendo este ter ocorrido devido às restrições difusionais, ou seja, limitações de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A medida da atividade da enzima foi realizada mediante a técnica de titulação, onde foi possível observar a rapidez da reação, como indicam os valores de  $V_{Max}$ .

Leite et al. (2006) encontraram valores de 0,23 e 0,32 mg mL<sup>-1</sup> para  $K_M$  e os valores de 0,244 e 0,053  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$  para  $V_{Max}$  para a PME extraída de goiaba. Arbaisah et al.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

(1997) avaliaram duas pectinametilesterases e encontraram valores de  $K_M$  de  $0,52 \text{ mg mL}^{-1}$  e de  $0,0843 \text{ mg mL}^{-1}$  e velocidades máximas de  $154 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e  $726 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

### CONCLUSÕES

A enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou o menor valor para o  $K_M$ , o que indica uma maior afinidade da enzima para com o substrato. Para o complexo Pectinex® Ultra SP-L, a enzima PME apresentou o maior valor de velocidade máxima ( $V_{Max}$ ). Deve-se levar em consideração que as técnicas de medida de atividade para as enzimas PMGL e PME são diferentes, e portanto, os resultados dos parâmetros cinéticos são decorrentes das técnicas utilizadas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbaisah, S.M., Asbi, B.A., Junainah, A.H., Jamilah, B. 1997. Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. *Food Chemistry*. v.59: 33-40.
- Ayers, W. A., Papavizas, G. C.; Diem, A. F. 1966. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.*, 56, 1006-1011.
- Dartora, A. B., Bertolin, T. E., Bilibio, D.; Silveira, M. M. E., Costa, J. 2002. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo polygalacturonase by solid state fermentation. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 666-670.
- Helbig, J., Laperche, S. 2001. Production of colour-intensive na colour stable juice. *Fruit Processing*, v.2: 324-347.
- Hultin, H. O., Sun, B., Bulger, J. 1966. Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties. *Journal of Food Science*, Chicago, 31 (3), 320-327.
- Leite, K., Tadiotti, A.C., Baldochi, D., Oliveira, O.M.M.F.O. 2006. Partial purification, heat stability and kinetic characterization of the pectinmethylesterase from *Brasilian guava, Paluma cultivars*. *Food Chemistry*. v.94: 565-572.
- Patel, R.N. 2002. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.804-826.
- Pitt, M. 1988. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: *Methods in Enzymology*. 161, 350-354.
- Pizarro, A. V. L., Park, E. Y., 2003. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*. 38:1077-1082.
- Torres, M.C.L., Soares, N. F. F., Maia, J.F. 2004. Parâmetros cinéticos da glutatona s-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.24: n.2: 243-248.