

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Rendimento de Imobilização de Pectinases Imobilizadas em Matriz Polimérica Inorgânica

Iloir Gaio^{1,3}, Carolina E. Demaman Oro², Ilizandra A. Fernandes², Cindy E. Bustamante Vargas², Rogério M. Dallago², Eunice Valduga² e Agenor Furigo Jr.¹

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

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

³Universidade Federal da Fronteira Sul –Campus Erechim
99700-000 Erechim - RS

RESUMO

As enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação. Para determinar a eficiência do processo de imobilização, é necessário realizar o cálculo do rendimento. Quanto mais eficiente é o processo de imobilização, maior será a quantidade de enzima encapsulada. 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 as enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME). As enzimas foram imobilizadas em suporte de gelatina-alginato e o rendimento de imobilização foi mensurado. A enzima PMGL do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash apresentou o maior rendimento de imobilização (316,0%), seguida da enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L (309,9%) em suporte de gelatina-alginato.

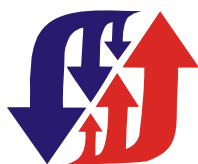
Palavras-chave: Imobilização; Gelatina-Alginato; Pectinases;

INTRODUÇÃO

A tecnologia de imobilização une os conhecimentos da química, bioquímica e biologia celular com aqueles da engenharia, buscando sempre ampliar às aplicações das enzimas na conversão de matérias-primas, normalmente de baixo custo, em produtos de maior valor agregado (MIRANDA, 2004).

As características das matrizes ou suportes são de grande importância na determinação da eficiência do sistema de imobilização. Ao selecionar um suporte para uma enzima, deve-se levar em conta fatores como pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, conjugação de cofatores e o processo de separação do substrato do produto (FLORES, 2011).

Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização nas indústrias de alimentos e bebidas (RODRÍGUEZ e SERRAT, 2008), assim como podem ser utilizadas em áreas diversas, como a indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, detergentes e no tratamento de efluentes (KASHYAP et al., 2001).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

As esferas de alginato cálcico representam um dos suportes mais comumente utilizados para a imobilização de enzimas e proteínas, assim como também para o controle da liberação de fármacos (ALMEIDA e ALMEIDA, 2004). As propriedades físicas dos alginatos são determinadas pela composição e a extensão das sequências dos ácidos e pela massa molecular; desta forma, alginatos com maior porcentagem de blocos G formam géis mais rígidos e quebradiços, que podem sofrer sinerese. Já os géis de alginato com maior porcentagens de blocos M são mais elásticos e dificilmente sofrem sinerese (IWAKI, 2010).

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.

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

Onde:

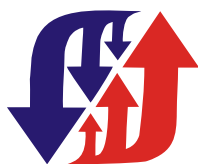
V = Volume de NaOH gasto em mL;

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.

Na imobilização foram empregadas gelatina e solução de CaCl_2 , segundo método proposto por Shen (2011) e Vargas (2013) com modificações. Para o preparo da solução gel, adicionou-se 10 mL de solução tampão oxalato de sódio e 2 % de alginato de sódio, que foram aquecidos ($\sim 60^{\circ}\text{C}$) até a dissolução. Após o resfriamento da solução gel, acrescentou-se 3 mL de extrato enzimático (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L). O gel formado foi gotejado em 50 mL de solução de CaCl_2 75 mmol/L previamente preparado com 1 % de gelatina. Em seguida, as microesferas foram lavadas com 100 mL de água destilada e 100 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 4,5) e então, armazenadas a 4°C em recipiente de plástico com tampa, sendo este recipiente plástico com a enzima colocado dentro de um vidro com sílica gel. Para determinar o rendimento da imobilização (RI) foram quantificadas as



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

atividades dos complexos enzimáticos Ultra SP-L e Mash (PME e PMGL) no extrato pectinolítico livre e imobilizado em suporte de alginato-gelatina bem como no sobrenadante. O cálculo do rendimento foi realizado de acordo com a Equação 3.

$$RI(\%) = \frac{(U_T - U_S)}{U_T} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

RI = Rendimento (%);

U_T = Atividade da enzima (U/mL – U/g) livre/imobilizada;

U_S = Atividade enzimática (U/mL) do sobrenadante.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O rendimento é um parâmetro para determinar a eficiência do processo de imobilização, sendo mais eficiente na medida que se consiga encapsular a maior quantidade de enzima possível. Após o encapsulamento do extrato enzimático pectinolítico, realizou-se a determinação do rendimento de imobilização. A Tabela 1 apresenta os resultados de rendimento obtidos nas matrizes de estudo.

Tabela 1 - Resultados referente ao rendimento de imobilização em gelatina-alginato para os complexos enzimáticos Pectinex® Ultra SP-L e Mash (enzimas PMGL e PME).

Parâmetros experimentais	PMGL		PME	
	Ultra SP-L	Mash	Ultra SP-L	Mash
Volume de extrato enzimático (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0
Atividade do extrato (U/mL)	16,6	17,5	31,6	34,1
Atividade total oferecida (U)	49,8	52,3	95,0	102,5
Massa de imobilizado (g)	10,67	10,26	10,67	10,26
Atividade do imobilizado (U/g)	13,1	13,2	23,0	18,17
Atividade total no imobilizado (U)	139,8	135,5	246,0	186,5
Volume de sobrenadante (mL)	47,0	47,0	47,0	47,0
Atividade do sobrenadante (U/mL)	0,1	0,2	0,07	0,08
Atividade total/sobrenadante (U)	4,7	9,4	3,4	3,9
Atividade teórica total no imobilizado (U) *	45,1	42,9	91,6	98,5
Rendimento de imobilização (%) **	309,9	316,0	268,5	189,2

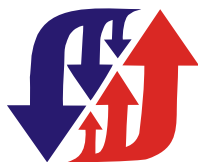
* Diferença entre a atividade total oferecida (49,8 U) e a atividade total no sobrenadante (4,7 U);

** Comparativo entre a atividade Total Teórica no imobilizado (45,1 U) e a Atividade Total no Imobilizado obtida Experimentalmente (139,8 U)

Obs. 1: Para a enzima PMGL, os ensaios em branco, ou seja, conduzidos com o suporte e o sobrenadante oriundos de uma simulação de imobilização sem o extrato enzimático, não apresentaram atividade.

Obs. 2: Para a enzima PME, o suporte e o sobrenadante oriundos de uma simulação experimental de imobilização sem o extrato enzimático apresentaram atividades de 0,49 U/g e 0,14 U/mL, respectivamente.

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que o maior rendimento de imobilização foi de 316,0% obtido pela enzima PMGL do complexo enzimático pectinolítico Pectinex®



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Mash, seguido de 309,9% da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L, 268,5% da enzima PME, do complexo enzimático pectinolítico Pectinex® Ultra SP-L e 189,2 da enzima PME do complexo enzimático pectinolítico Pectinex® Mash. Todas as enzimas em estudo mostraram afinidade com o suporte, permitindo assim, o encapsulamento da enzima no suporte. Vargas et al. (2015), imobilizaram extrato pectinolítico em polímero inorgânico de alginato-gelatina-cálcio e obtiveram 72,7% de rendimento imobilizado em pH de 5,5.

CONCLUSÕES

A enzima PMGL do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash apresentou o maior rendimento de imobilização (316,0%), seguida da enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L (309,9%) em suporte de gelatina-alginato. As enzimas mostraram-se estáveis para o suporte em estudo, tendo muitas aplicações na indústria de alimentos, podendo ser utilizadas para a clarificação de sucos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, P., Almeida, A. 2004. Cross-linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol, *Journal of Controlled Release*, v. 97, p. 431– 439.
- Ayers, W. A., Papavizas, G. C., Diem, A. F. 1966. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.*, 56, 1006-1011.
- Flores, G. 2011. Efecto de un proceso de inmovilización por gelación iónica sobre a actividad proteolítica de mexicana. Tesis (Maestría en Ciencia en Bioprocesos) – Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología-Instituto Politécnico Nacional, Mexico D.F.
- 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.
- Iwaki, Y. 2010. Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Kashyap, D.R.; Vobra, P.K.; Chopra, S.; Tewari. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. v.77, p. 215-227.
- Miranda, M. 2004. Aprimoramento do Procedimento de Imobilização da Lipase Microbiana em Óxido de Nióbio para Modificação de Óleos Vegetais. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São Paulo, Brasil.
- Pitt, M. 1988. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: *Methods in Enzymology*. 161, 350-354.
- Rodríguez, O.; Serrat, M. 2008. Poligalacturonasas de levaduras: Un producto biotecnológico de grandes potencialidades, *Tecnología Química*, v. 28, n. 1, p. 80-90.
- Shen, Q., YANGA, R., Hua, X., Ye, F., Zhang, W., Zhao, W. 2011. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1565–1571.
- Vargas, C. E. B. 2013. Estudo da Imobilização do Extrato Enzimático Pectinolítico de *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Matriz Polimérica - Inorgânica. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, Erechim.
- Vargas, C. E. B., Mignoni, M., Oliveira, D., Venquiaruto, L. D., Valduga, E., Toniazzo, G., Dallago, R. M. 2015. Synthesis of a hybrid polymeric-inorganic biomimetic support incorporating in situ pectinase from *Aspergillus Níger* ATCC 9642. *Byoprocess Biosyst Eng*. Published on line: 19 Abril.