



**URI** | ERECHIM

ENZITEC 2016  
XII SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA  
17 a 20 de Julho de 2016 – Universidade de Caxias do Sul

The banner features a central graphic of two interlocking arrows, one blue pointing down and one red pointing up, with a white 'X' over them. The background is a light-colored grid with various chemical and biological terms like 'Caprolactam degradation', 'Maltose metabolism', and 'Down degradation'.

## Desenvolvimento de estruturas para utilização na imobilização de enzimas para a indústria de alimentos

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

# PROCESOS ENZIMÁTICOS

PRODUÇÃO

PURIFICAÇÃO

IMOBILIZAÇÃO

APLICAÇÃO

AVALIAÇÃO EFICIÊNCIA

MÉTODO ANALÍTICO

## QUESTIONAMENTOS

**MÉTODO MAIS EMPREGADOS**  
Colorimétrico e volumétrico



**Pouco Seletivos**  
**Interferências**

**APLICAÇÃO SEM CONHECIMENTO DO**  
**MÉTODO**



**Etapas diferentes**  
**Mesma metodologia**



**Dificuldade de**  
**Interpretação das Fórmulas**

**Método de Bradford**



**Teor de proteína**



**Calcular**

- \* Atividade específica
- \* Fator purificação



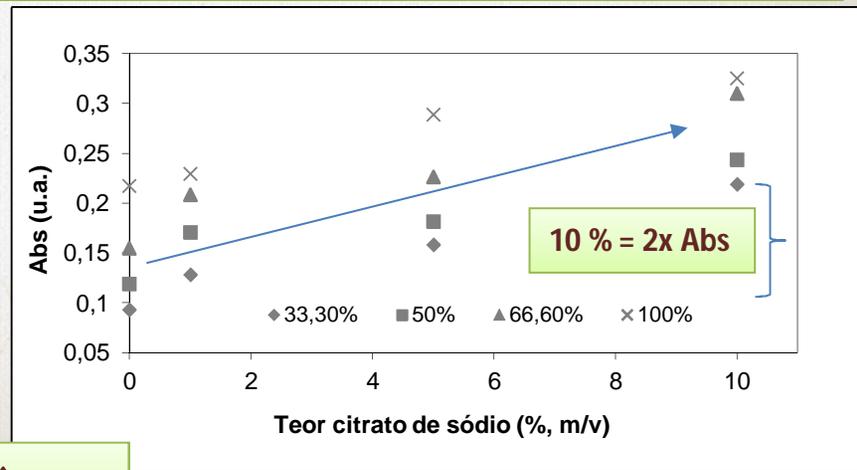
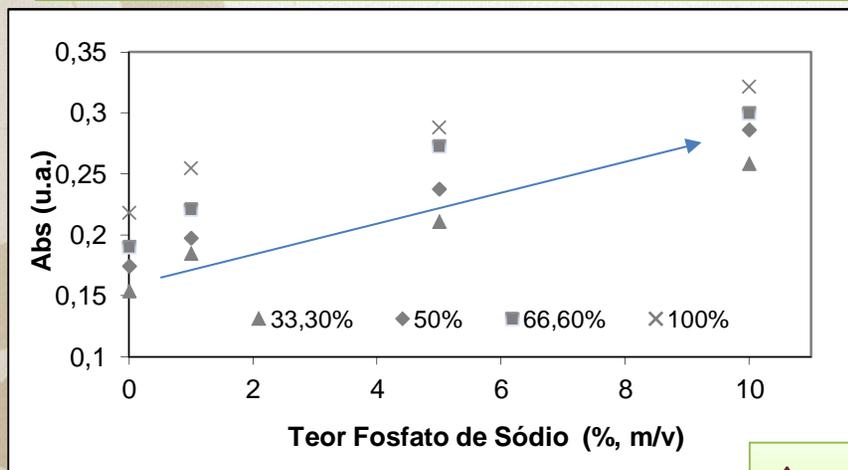
**Método colorimétrico**



- \* Baixa seletividade
- \* Sujeito a interferências

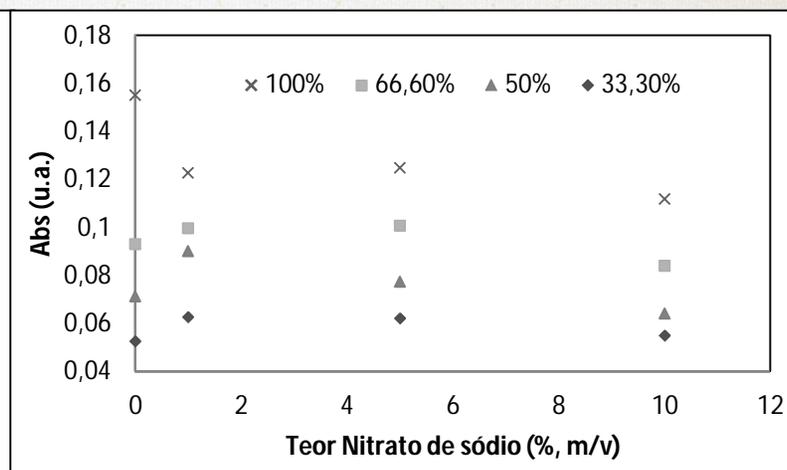
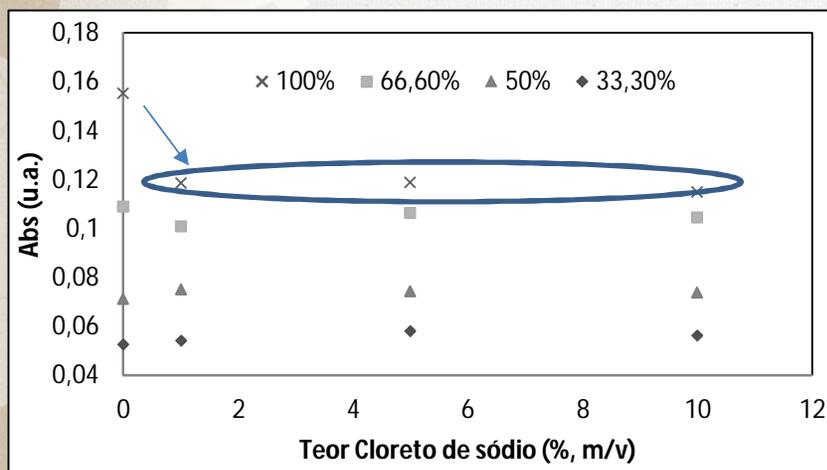
# INTERFERÊNCIAS INTENSIDADE DA COR COMPOSTOS IÔNICOS

**A Cor: Ligação do Reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) com a proteína.**  
Interação eletrostática entre os grupos sulfônicos ( $-SO_3^-$ ) do corante e os grupos funcionais de carga positiva de enzima.



↑ Abs ↑ [Sal]

## INTERFERÊNCIAS INTENSIDADE DA COR COMPOSTOS IÔNICOS

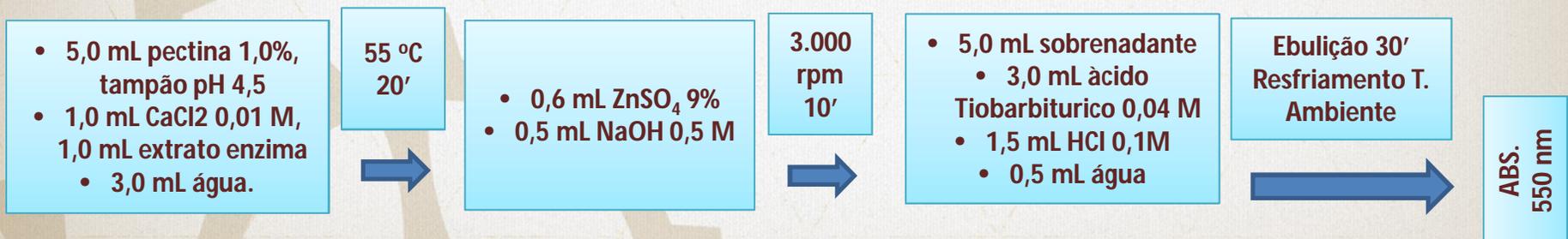


Menor interferência e quando ocorre o Efeito Contrário, ↓ Abs c/ Adição de sal

GOLUNSKI, S.; DALLAGO, R.M.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. et al., **Interference of salts used on aqueous two-phase systems on the quantification of total proteins.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v.83, p.30 - 33, 2016

## ATIVIDADE DA PECTINA LIASE

**MÉTODO COLORIMÉTRICO DESCRITOS PRO AYERS ET AL, 1966, PITT, 1988.  
ONDE  $\Delta$ Abs de 0,01 UNIDADE = 1 UNIDADE DE ATIVIDADE**



- AYRES, W.A.; PAPAVIDAS, G.C.; DIEM, A.F., Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*, **Phytopatol**, 56, 1006-1011, 1966.
- PITT, M., Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: **Methods in Enzymology**, 161, 350-354, 1988.

## IMOBILIZAÇÃO



## SUportes

Obter derivados insolúveis no meio reacional com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo.

Eficiência na imobilização;

Conservação estrutura proteica.

### PERMITINDO

- \* FÁCIL SEPARAÇÃO;
- \* REUSO;
- \* USO CONTÍNUO.

### Características

- Resistência física, química e microbiológica;
- Biocompatibilidade;
- Disponibilidade;
- Baixo custo.

**Em relação aos suportes, nosso grupo tem focado as pesquisas em:**

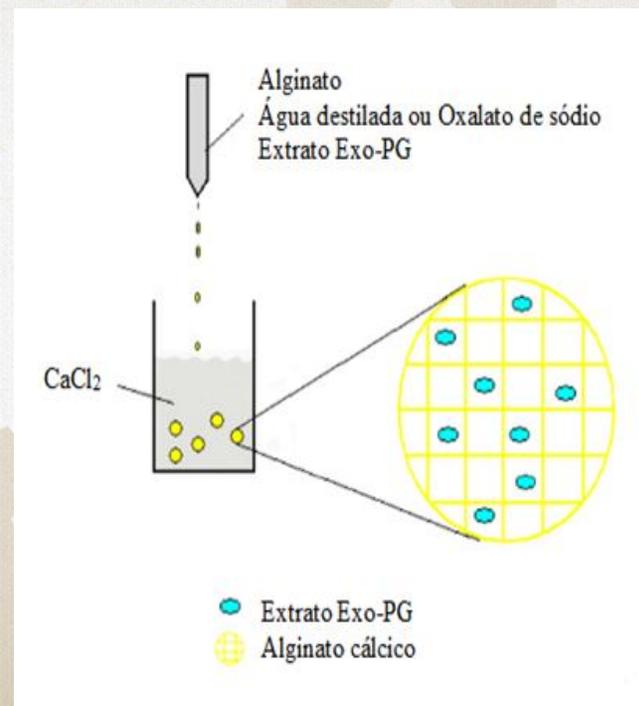
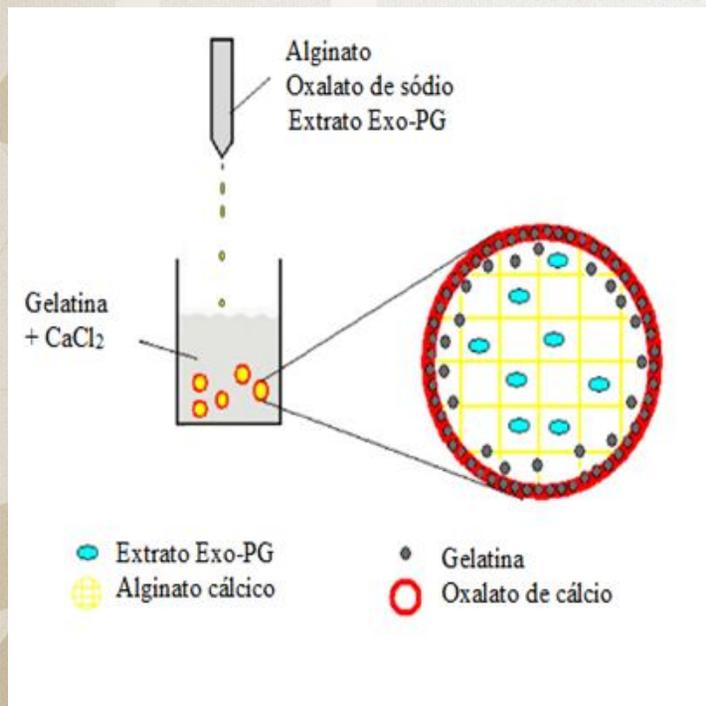
**Materiais Híbridos:  
MATRIZES POLIMÉRICAS-  
INORGÂNICAS**

**Poliuretano**

**Sílicas**

**Apresentam como  
peculiaridade o fato de  
as enzimas serem  
incorporadas durante a  
etapa de síntese.**

## Materiais Híbridos: MATRIZES POLIMÉRICAS-INORGÂNICAS ALGINATO/GELATINA



**Referência:**  
**β-galactosidase**  
**Tampão Fosfato**  
**pH = 7,0**



**Exo-PG**  
**Tampão Fosfato**  
**pH = 5,5**



**Não Formou**  
**S/ Atividade**

- **Imobilização do extrato enzimático de Exo-POLIGACTURONASE**

# Materiais Híbridos: MATRIZES POLIMÉRICAS- INORGÂNICAS

pH = 5,5 – Não ppt  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Escolha do Tampão  
ppt c/ Ca pH 5,5



(A) Acetato; (C) citrato;  
(F) fosfato; (O) oxalato



Lavagem c/  
oxalato



Lavagem c/  
acetato

## Armazenamento Atividade (U/g) após 24 hs

Solução tampão	Atividade (U/g)
Acetato de sódio (100 mM, pH 5,5)	1,724 ± 0,22
Acetato de sódio (100 mM, pH 7,5)	0,882 ± 0,35
Fosfato de potássio (100 mM, pH 5,5)	0,224 ± 0,07
Fosfato de potássio (100 mM pH 7,5)	Sem Atividade
Atividade inicial da enzima imobilizada 1,884 U/g ± 0,096. U=µmol/min	

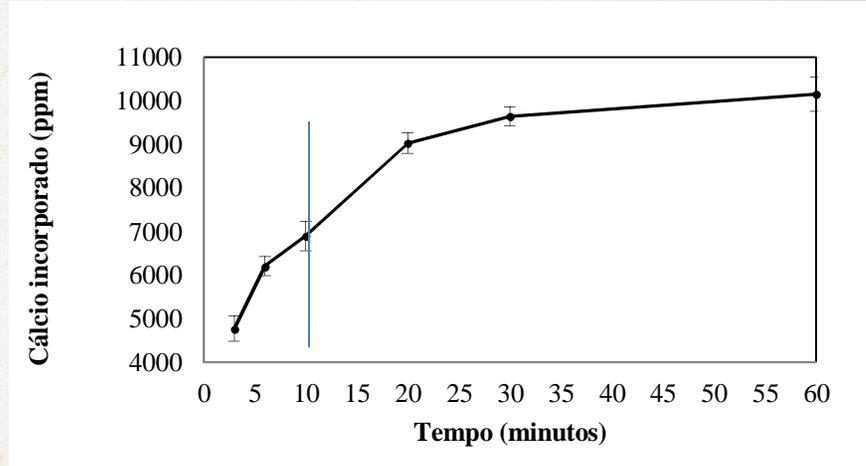
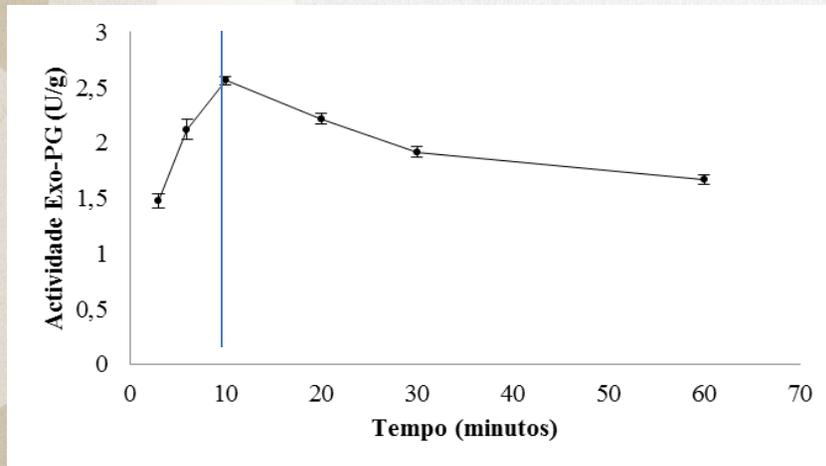


**Absorção tampão  
Deterioração 48 hs**



**Filtradas  
Armazenadas em  
frasco c/ sílica**

## Efeito Tempo de contato c/ solução Ca



**↑Tempo; ↑ Teor Cálcio, ↓Atividade**

**Obstrução dos poros**

## Cinética do tempo de ótimo de reação para medida de atividade

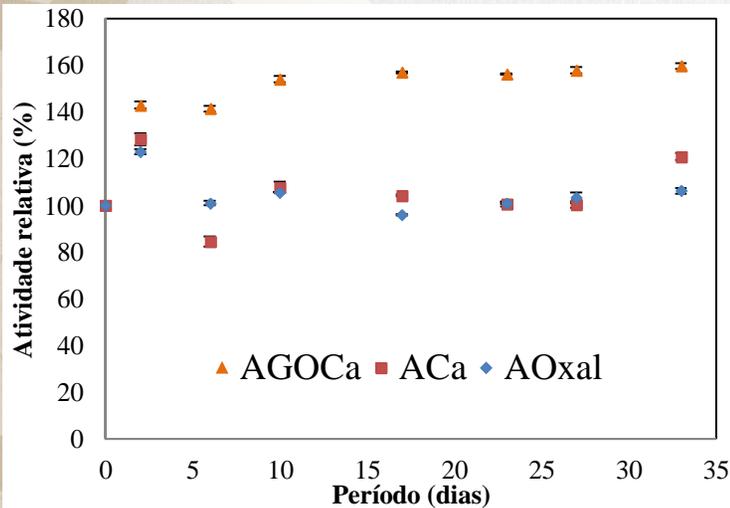
Tempo (min)	Atividade poligalacturonásica (U/g)*
3	1,56 ± 0,05 <sup>b</sup>
5	1,54 ± 0,12 <sup>b</sup>
10	1,84 ± 0,12 <sup>ab</sup>
20	2,03 ± 0,20 <sup>a</sup>

## Rendimento

Matriz	RI(%)
AGOCa	72,70 ± 1,64 <sup>a</sup>
AOxal	55,58 ± 1,26 <sup>b</sup>
ACa	52,97 ± 1,04 <sup>b</sup>

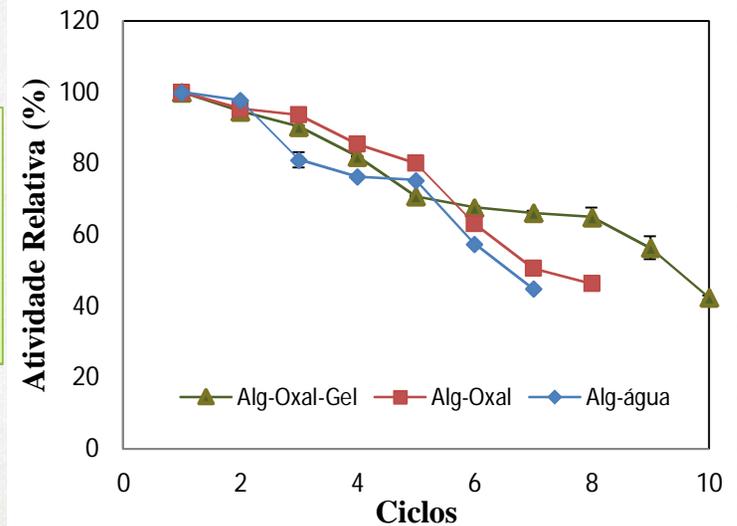
VARGAS, C. E. B.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; PAROUL, NATALIA; DALLAGO, R. M.; VENQUIARUTO, L. D.; OLIVEIRA, D. **Biomimetic Mineralization of the Alginate/Gelatin/Calcium Oxalate Matrix for Immobilization of Pectinase: Influence of Matrix on the Pectinolytic Activity.** *Applied Biochemistry and Biotechnology.* v.1, p.1 - 7 , 2016.

## Estabilidade Armazenamento (4 °C)



Atividade residual  
 AGOCa = 159,7 %  
 AOxal = 106,2 %  
 ACa = 120,9 %

## Reuso



VARGAS, C. E. B.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; PAROUL, NATALIA; DALLAGO, R. M.; VENQUIARUTO, L. D.; OLIVEIRA, D. **Biomimetic Mineralization of the Alginate/Gelatin/Calcium Oxalate Matrix for Immobilization of Pectinase: Influence of Matrix on the Pectinolytic Activity.** *Applied Biochemistry and Biotechnology.* v.1, p.1 - 7 , 2016.



+



**POLIURETANO (PU)  
RÇ RÁPIDA (5')**



**1º ENSAIOS  
POLIOL:ISOCIANATO (1:1) (50 mL:50 mL)**

**REAÇÃO EXOTÉRMICA**

**INATIVAÇÃO  
ENZIMÁTICA**

**Table 1 - Variation of reaction temperature as a function of monomers volume.**

Run	Isocyanate (mL)	Polyol (mL)	Temperature (°C)
1	1	1	42
2	3	3	57
3	5	5	57
4	10	10	77
5	50	50	85

**POLIURETANO (PU)  
ISOCIANATO: POLIOL (4 mL : 6mL)**

**TESTADO PARA  
IMOBILIZAÇÃO**

**INULINASES**

**LIPASES**

**PECTINASES**

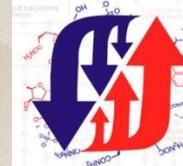
**OTIMIZAÇÃO**

**FORMA DE ADIÇÃO  
SÓLIDA OU EM SOLUÇÃO**

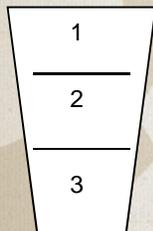
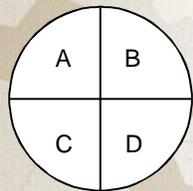
**MASSA ADICIONADA**

**DISTRIBUIÇÃO NO SUPORTE**

# POLIURETANO (PU) INULINASE



## DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE



REGIÃO		Atividade(U/g) Sacarose
	1	200,6
	2	206,7
	3	207,1
B	1	196,2
	2	194,1
	3	179,2
C	1	126,4
	2	171,9
	3	155,8
D	1	120,5
	2	139,2
	3	125,6

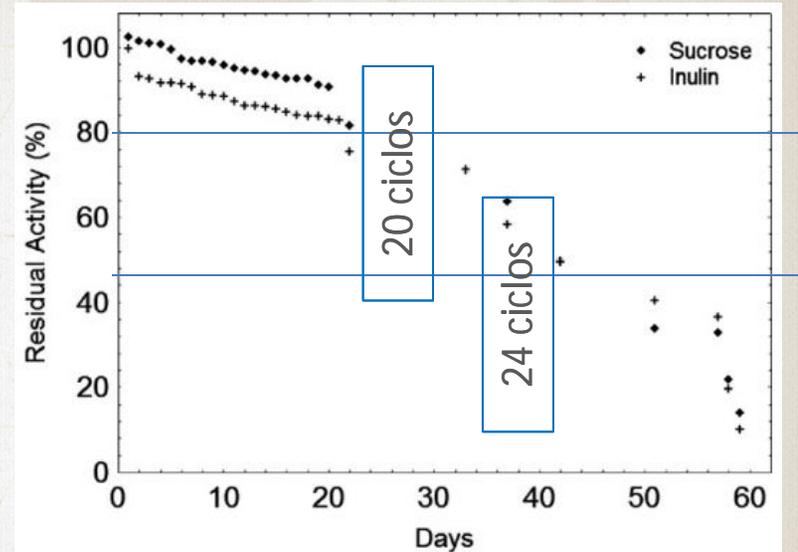


Fig. 2 – Residual activity for the reuse of the inulinase immobilized in polyurethane using sucrose (a) and inulin (b) as substrate.

Silva, M.F.; Dallago, R. M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food and Bioproducts Processing*, v.91, p.54 - 59, 2013

LIOFILIZADA - 10% (M/V)



BOAS PROPRIEDADES FÍSICAS

ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO

Amostras	Atividade Enzimática (U/g)
Superior	31,4
Médio	63,8
Inferior	472,7

- Distribuição heterogênea da enzima;
- Provavelmente devido a Densidade da enzima liofilizada;

# POLIURETANO (PU) LIPASE



SOLUÇÃO 2%  
(10% V/V)

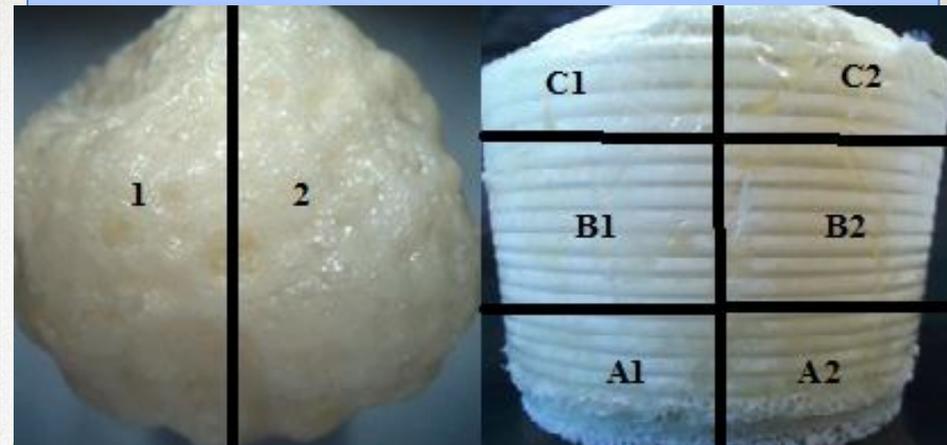
ACETONA

ETANOL

ÁGUA

Estrutura polimérica  
rígida, compacta e  
bifásica, s/atividade

Poliuretano sintetizado



VISTA SUPERIOR

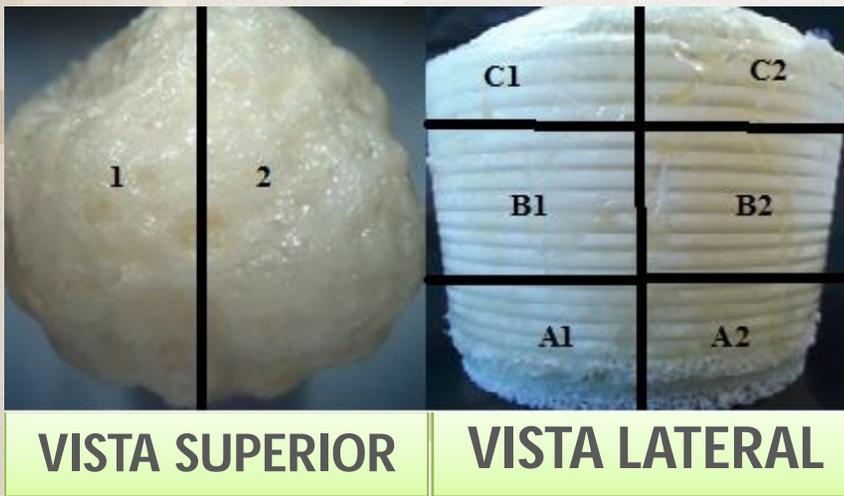
VISTA LATERAL

Boa polimerização

ETANOL  
S/ Atividade

ÁGUA  
C/ Atividade

# POLIURETANO (PU) LIPASE

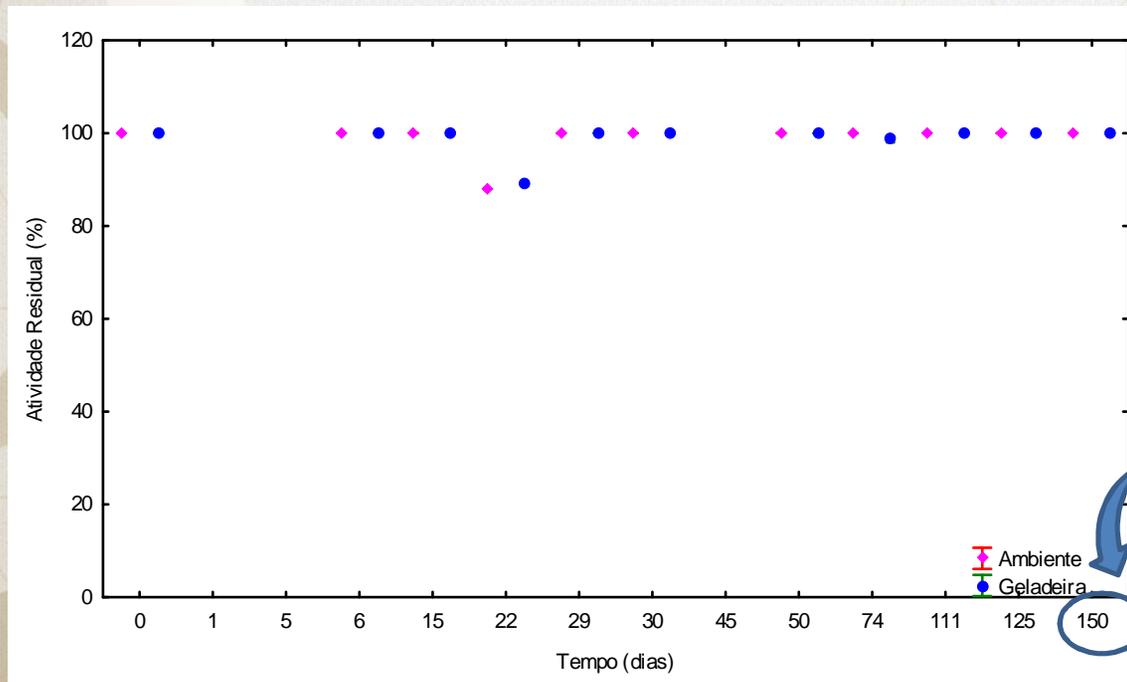


Fração	Atividade Esterificação (U/g)
1A	958,5 ± 149,2 <sup>a</sup>
1B	895,5 ± 163,0 <sup>a</sup>
2A	917,9 ± 101,4 <sup>a</sup>
2B	947,6 ± 69,0 <sup>a</sup>
3A	911,1 ± 115,3 <sup>a</sup>
3B	900,3 ± 106,1 <sup>a</sup>



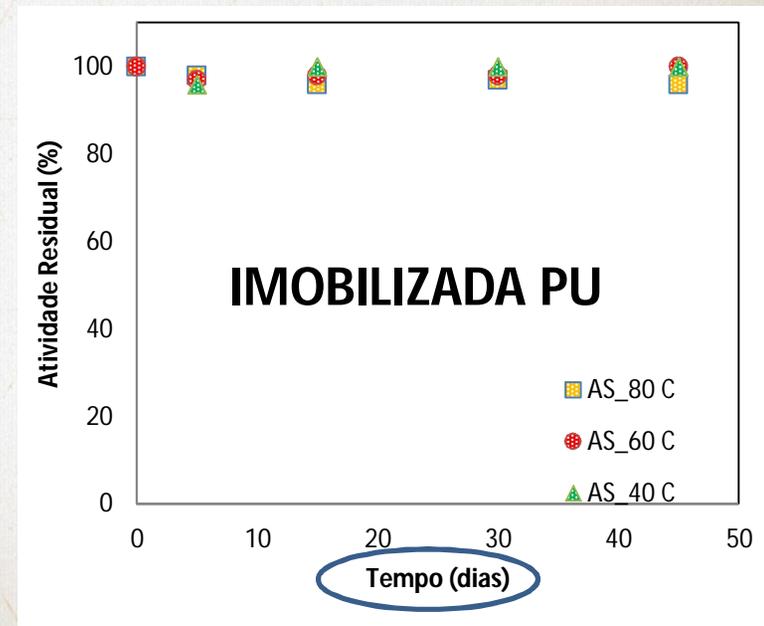
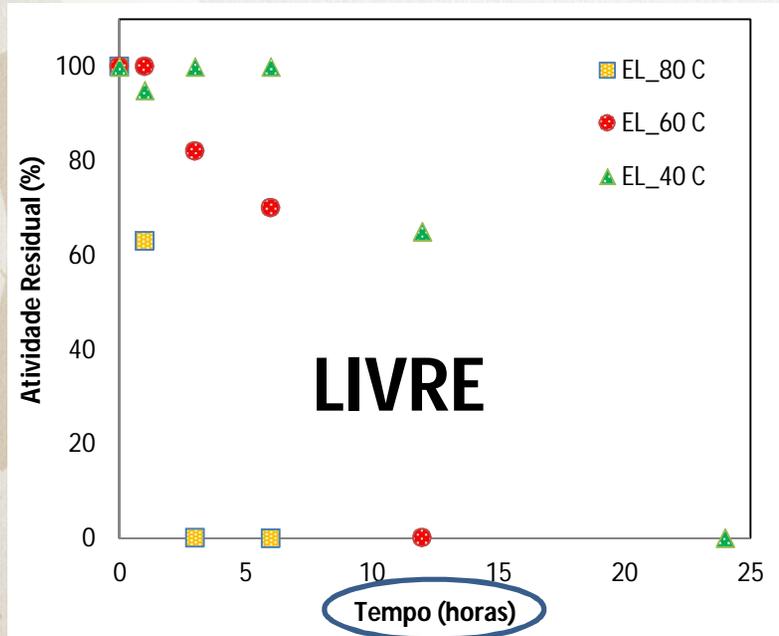
**RENDIMENTO IMOBILIZAÇÃO  
DE ≈ 250 %**

## Estabilidade da Enzima Imobilizada em PU armazenada à baixas temperaturas

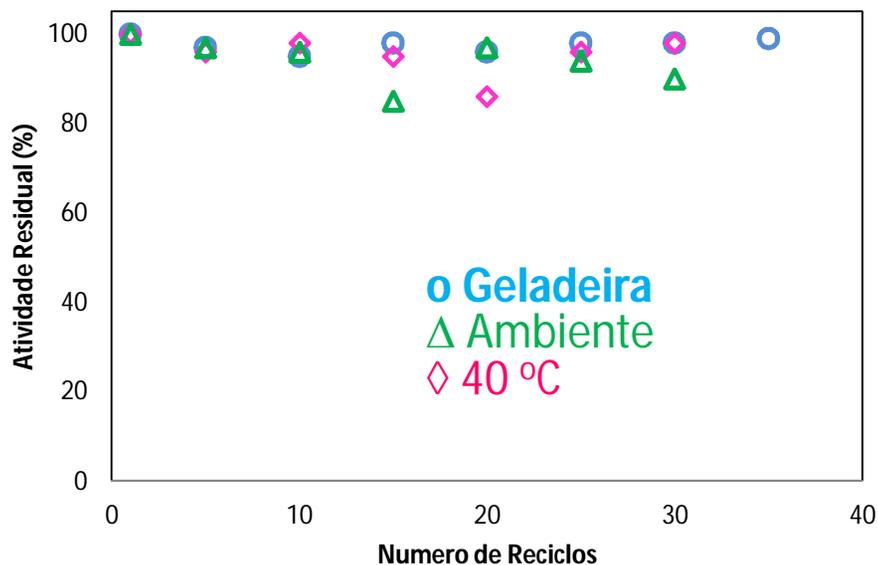


**150 dias**

## Estabilidade da Enzima Imobilizada em PU armazenada à altas temperaturas



## REUSO



## Aplicação Síntese de Ésteres

**Table 2**

Reaction yield obtained in the catalyzed reactions by immobilized CALB lipase in polyurethane.

Enzymatic synthesis	Yield (%)		
	Molar ratio (acid/alkohol)		
	(1/3)	(3/1)	(1/1)
Geranyl oleate	10.3	26.5	33.9
Geranyl propionate	96.6	97.3	97.7
Ethyl oleate	96.6	98.0	99.9

DALLAGO, R. M.; NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; VARGAS, C. E. B.; STEFFENS, C.; ZENI, J.; OLIVEIRA, D.; RIGO, E., **In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support.** *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v.124, p.52 - 61, 2016..

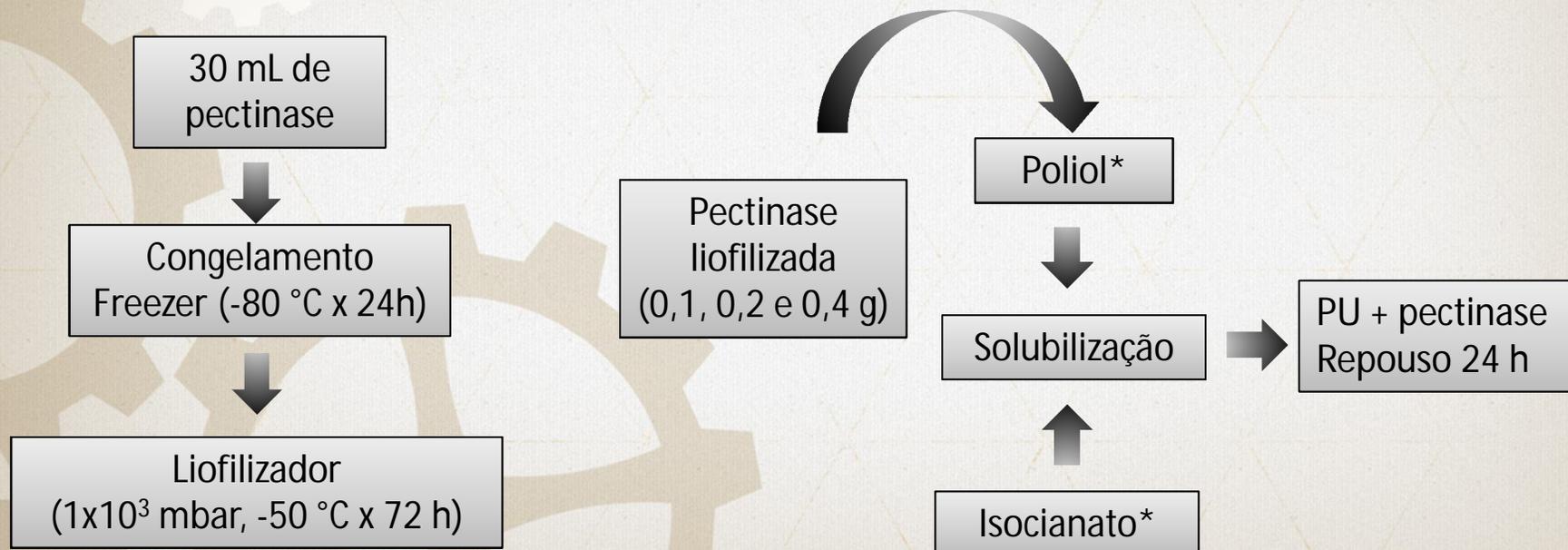
## Perfil enzimático e proteico da pectinase comercial

Atividade enzimática específica (U mg <sup>-1</sup> proteína)					Proteína total (mg mL <sup>-1</sup> )
PG	PME	PL	FPase	XE	
612,92 ± 7,06	98,8 ± 3,63	12,5 ± 3,96	2,0 ± 0,53	68,13 ± 0,12	0,39 ± 0,02

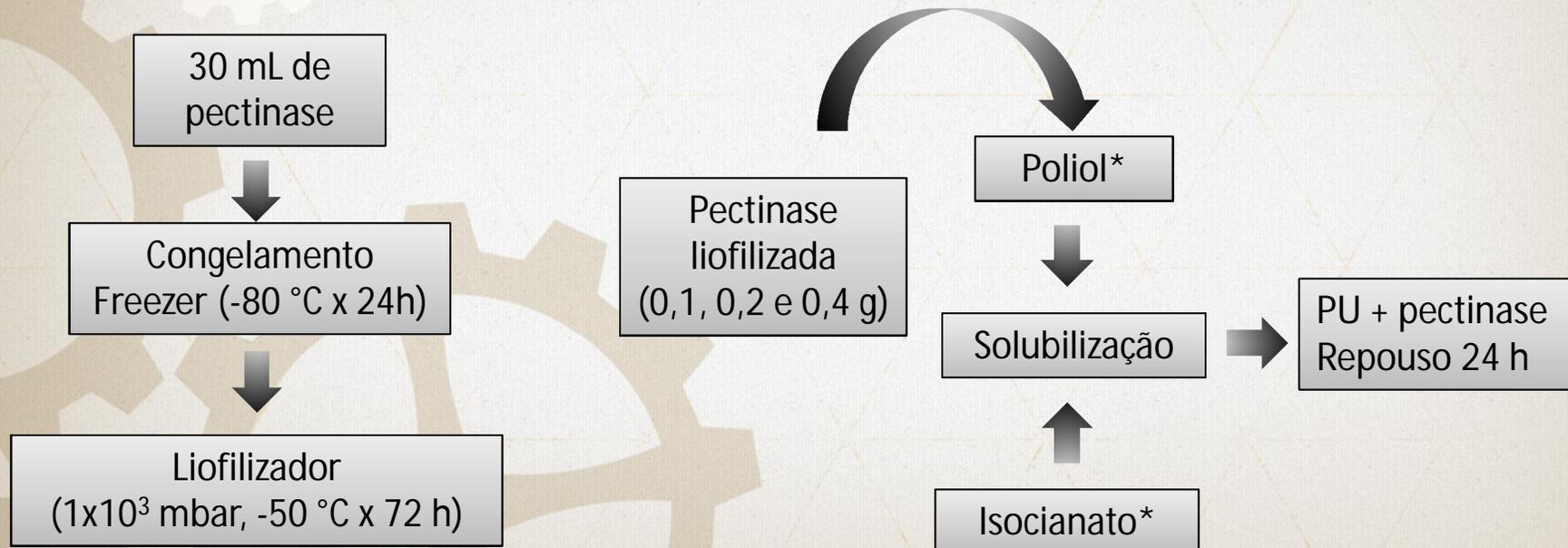
**↑ Ativ. Poligaracturonase e Pectinametilesterase**

Testes preliminares com a pectinase líquida: **perda total da atividade**; resultado associado ao efeito do calor durante a polimerização do PU.

## Liofilização e Imobilização da pectinase comercial



## Liofilização e Imobilização da pectinase comercial

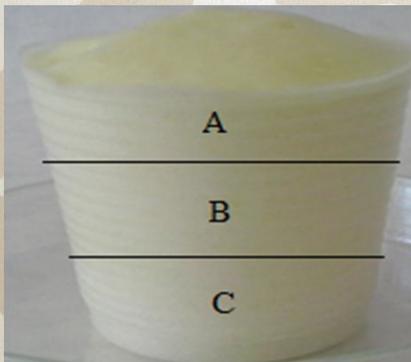
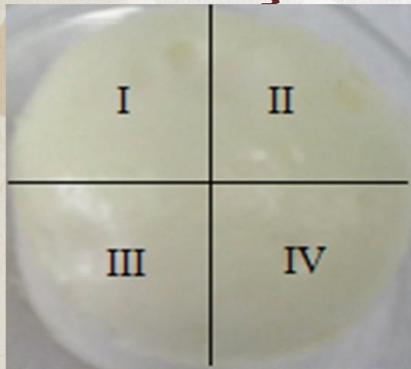


**Efeito da quantidade inicial de pectinase liofilizada sobre a atividade enzimática (pH 4,5; 37 °C) e o rendimento de imobilização ( $\gamma$ ).**

Pectinase imobilizada em RFPU					
Pectinase liofilizada adicionada (g)	Atividade oferecida ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Massa total gerada (g)	Atividade pectinolítica ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	Atividade total ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	$\gamma$ (%)
0,1	41,97	5,18	$16,20 \pm 0,57^a$	$83,89 \pm 2,95^a$	$199,90 \pm 7,03^a$
0,2	83,94	5,29	$28,33 \pm 1,46^b$	$149,94 \pm 7,75^b$	$178,64 \pm 9,40^a$
0,4	167,87	5,49	$30,16 \pm 0,70^b$	$165,49 \pm 3,82^b$	$98,58 \pm 2,28^b$

↓  $\gamma$  (%) vinculado a  **saturação da superfície**  do suporte com o  **excesso de enzima**  oferecida, causado pelo fenômeno de aglomeração, bloqueios dos sítios da enzima.

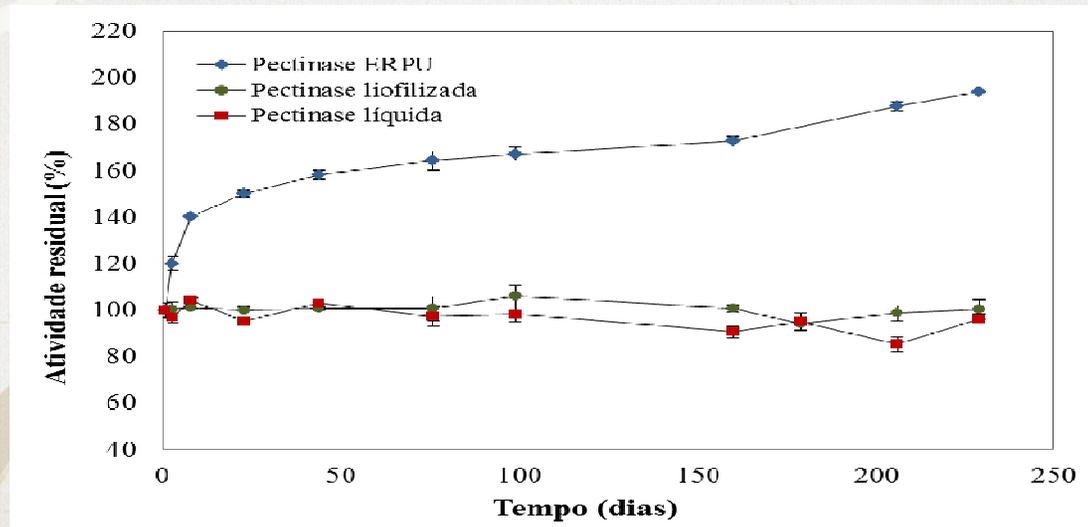
## Avaliação da distribuição da pectinase na ERPU



Corte	Atividade pectinolítica (U g <sup>-1</sup> )
<i>Longitudinal</i>	
<i>Média das Frações A, B e C</i>	
I	24,68 <sup>a</sup> ± 5,23
II	25,99 <sup>a</sup> ± 2,36
III	23,25 <sup>a</sup> ± 2,92
IV	27,35 <sup>a</sup> ± 5,01
<i>Transversal</i>	
<i>Média das Frações I, II, III e IV</i>	
A	23,29 <sup>a</sup> ± 2,48
B	23,22 <sup>a</sup> ± 2,41
C	29,44 <sup>b</sup> ± 2,78

**Distribuição relativamente homogênea**

## Estabilidade ao armazenamento

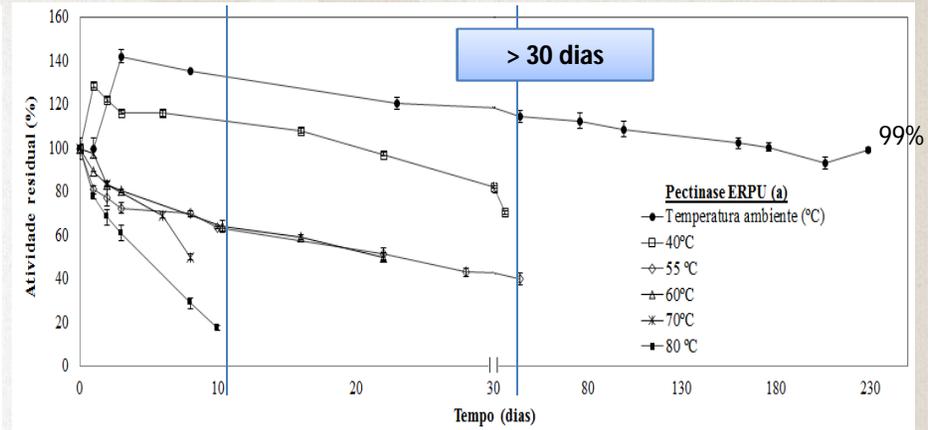
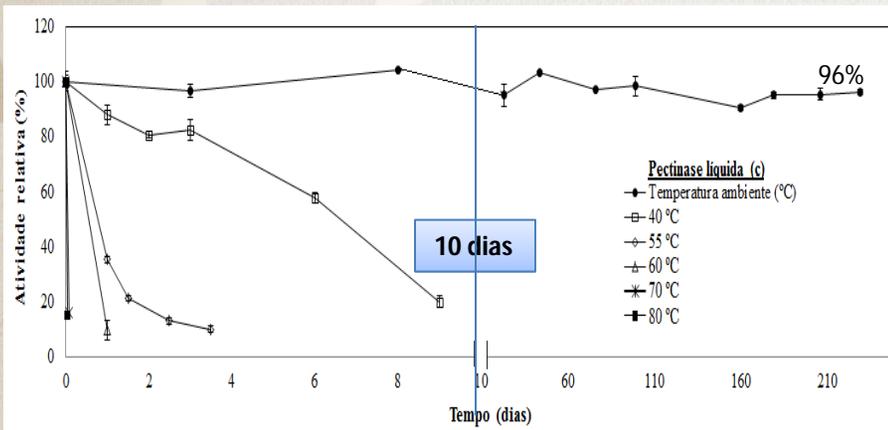


4°C por 229 dias

P. ERPU: 194% AR

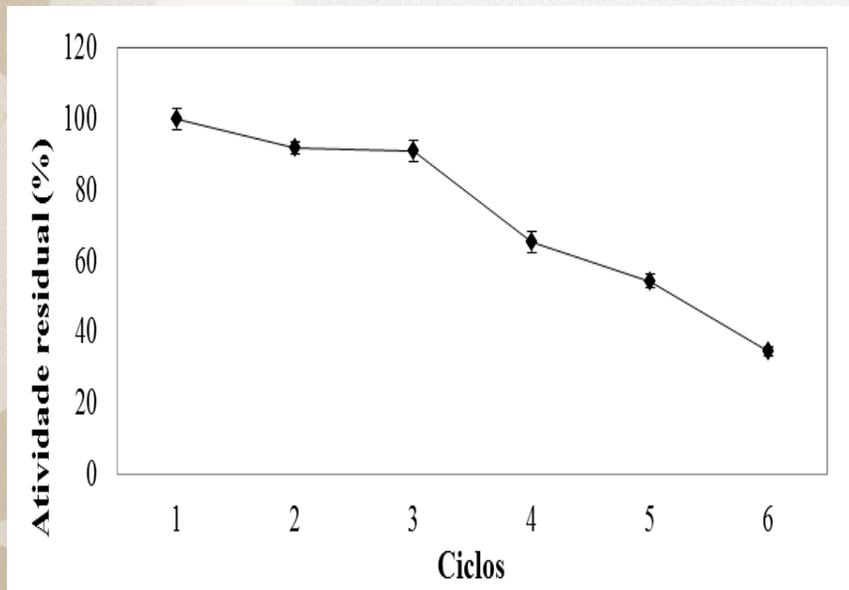
Perfil de estabilidade ao armazenamento a 4 °C para a enzima livre e imobilizada em ERPU.

## Estabilidade térmica



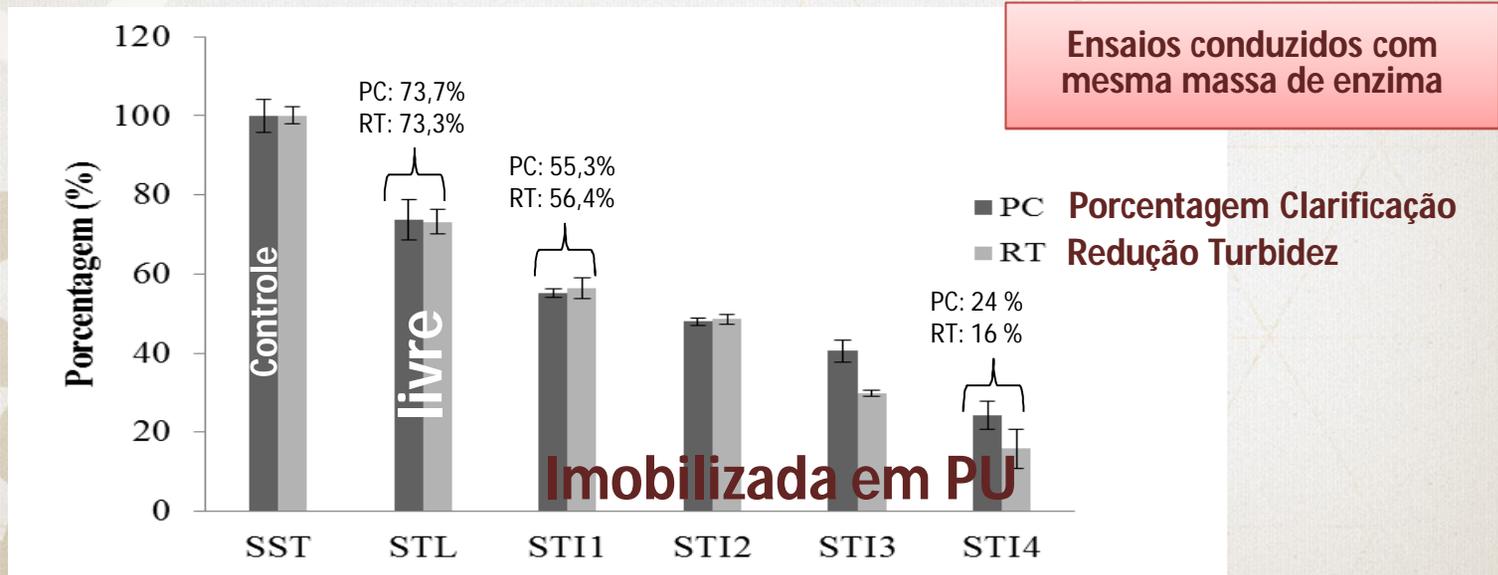
- **Maior estabilidade pectinase ERPU: sugere a eficiência do método de imobilização**

## Estabilidade operacional



- Fácil recuperação e reuso;
- 6 ciclos (35 % ativ. Inicial);
- Lixiviação da enzima do suporte ou inativação.

## Aplicação = clarificação de suco de goiaba



BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. A.; TONIAZZO, G., **In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides.** *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.* v.122, p.35 - 43, 2015

## METODOLOGIA - IMOBILIZAÇÃO PELA TÉCNICA DE SOL-GEL

- 5 mL TEOS
- 5 mL EtOH
- 1,61 mL H<sub>2</sub>O
- 3 gotas catalisador
  - HCl ou
  - NH<sub>4</sub>OH ou
  - HBr



Agitador orbital  
(shaker)

- 90 min
- 40°C
- 180 rpm

- 1 mL solução enzimática (0,16 g de enzima)

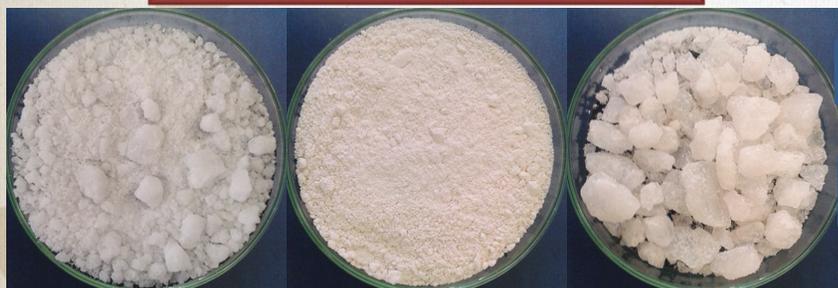
- 1 mL solução de PEG 1500 (0,05 g) **Amostras com aditivo**

- 1,75 mL da solução hidrolisante  
(0,25 mL de hidróxido de amônia em 1,5 mL de álcool etílico)

Após a Síntese



Após a Secagem em estufa



Derivado  
Ácido

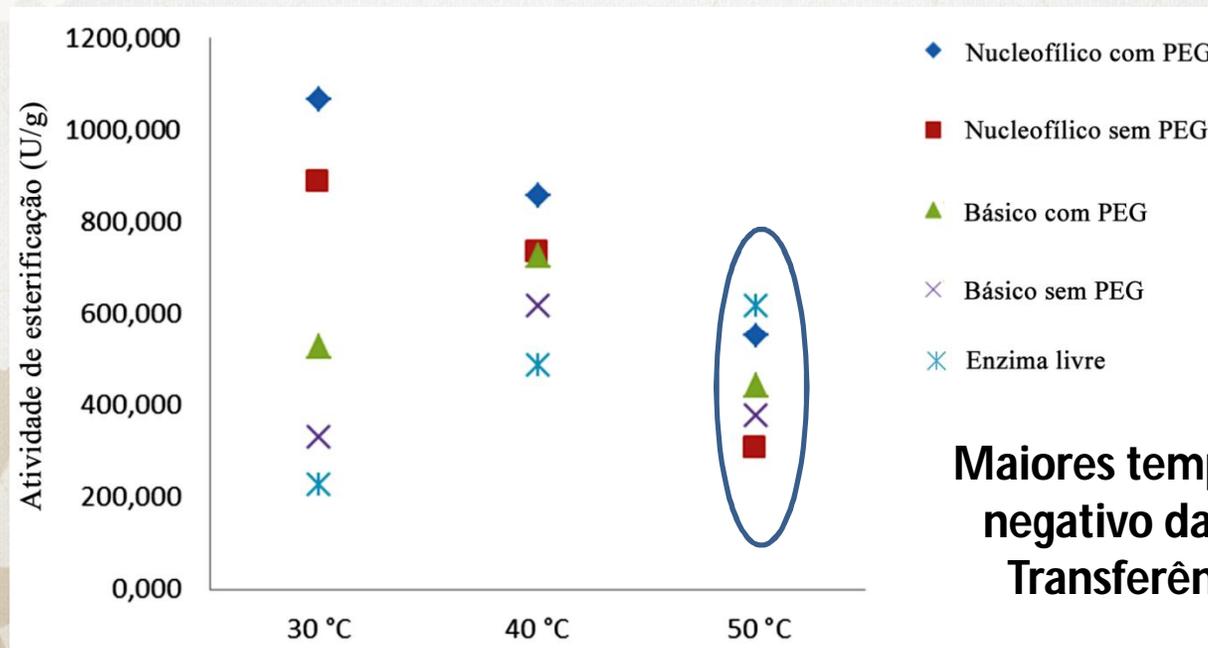
Derivado  
Básico

Derivado  
Nucleofílico

Biocatalisador	Massa Seca (g)	Atividade (U/g suporte)	Rendimento (%)
Ácido	2,16	197,05	54,77
Ácido c/ aditivo	2,54	209,80	68,28
Básico	1,17	177,00	26,49
Básico c/ aditivo	1,48	378,78	72,03
Nucleofílico	2,03	148,46	38,72
Nucleofílico c/ aditivo	2,75	260,63	92,18

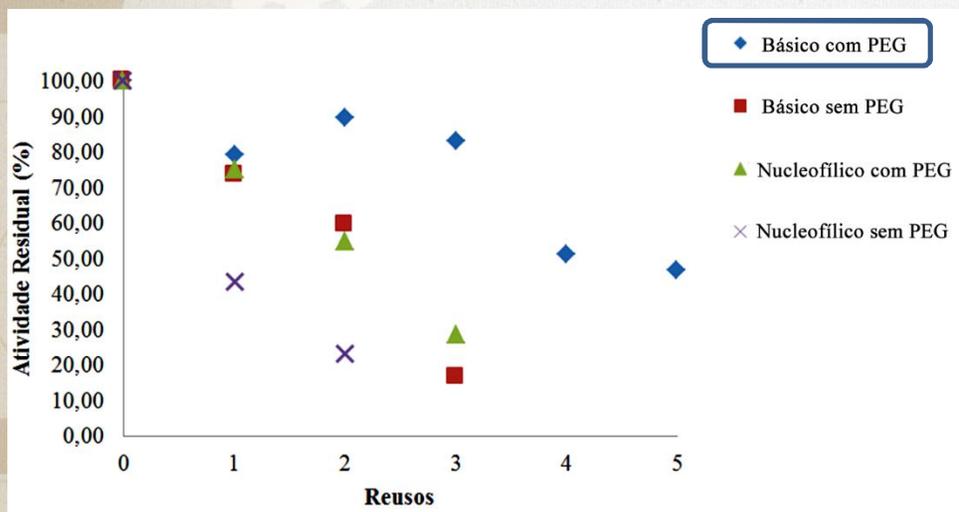
Aditivo PEG 1500 melhora o rendimento de imobilização e a massa de imobilizado

## Atividade de esterificação em diferentes temperaturas na reação de síntese



**Maiores temperatura efeito negativo da imobilização  
Transferência do Calor**

## Reuso



## Aplicação / Éster

Suporte

Conversão Acetato  
isoamila (%)

nucleofílico

65,88

básico

71,34

FICANHA, A. M. M.; NYARI, N. L. D.; LEVANDOSKI, K.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M., **STUDY OF IMMOBILIZATION OF LIPASE IN SILICA BY THE SOL-GEL TECHNIQUE.** *Química Nova* v.38, p.364 - 369, 2015.

**Não existe procedimento definitivo para a escolha do melhor método de imobilização, o que se adequa bem para uma enzima pode não servir para outra.**



**Fique atento, pois de onde vc menos espera pode surgir uma boa ideia.**

# AGRADECIMENTOS

## EX-PPG



## ATUAIS



**OBRIGADO POR COMPARTILHAREM SEUS  
CONHECIMENTOS E ACREDITARAM NAS MINHAS IDEIAS**

# AGRADECIMENTOS





**URI** | ERECHIM



Obrigada pela  
atenção!

# AGARDECIMENTOS

