

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS EM PECTINA EXTRAÍDA DE FIBRA DE PASSIFLORA EDULIS FLAVICARPA

D. A. B. PEREIRA¹, J. B. M. ROCHA NETO¹, C. M. G. F. LEMOS¹ e L. R. B. GONÇALVES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: lrg@ufc.br

RESUMO – A pectina é um polissacarídeo ramificado, composto principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. A porcentagem de ácido D–galacturônico esterificado com metanol é o que nos diz o grau de esterificação. Na literatura está relatado que as pectinas que têm um baixo grau de esterificação têm uma excelente capacidade de formar géis. Neste estudo foi extraída pectina da fibra de maracujá (*Passiflora edulis*) para a sua posterior utilização como suporte enzimático da enzima protease de *Bacillus amyloliquefaciens*. A referida enzima foi imobilizada em pectina-glutaraldeído 25%. Aqui **resultados**.

1. INTRODUÇÃO

Com uma crescente preocupação com as questões ambientais, cada vez mais a busca por desenvolvimento e uso de materiais biodegradáveis (Chandra et al, 1998) é intensificada. Nesse contexto se encontram os biopolímeros, eles tem sido o foco de pesquisas em diversas áreas, como na indústria de alimentos e no desenvolvimento de mecanismos de bioremediação (Tang et al, 2012; Kostal et al, 2005), principalmente por serem produzidos de fontes renováveis e por serem biodegradáveis, fazendo o seu uso menos nocivo ao ambiente se comparado com os polímeros sintéticos, principalmente os que tem sua origem no petróleo.

A pectina é um biopolímero de extrema importância para na constituição de vegetais, ela é parte integrante da parede celular presente em células vegetais (Carpita, 2000). Outra importante característica desse material é sua capacidade de atuar como agente gelificante e isso é devido ao grande número de ramificações presentes em sua estrutura, as quais são capazes de aprisionar moléculas de água, conferindo assim um aspecto mais gelatinoso ao meio onde é inserida (Voragen et al, 2009). Na bioquímica ela é classificada como um polissacarídeo ramificado, seus componentes principais são ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose (Voragen et al, 1995; Pérez, 2003). As pectinas são na verdade uma classe de moléculas que se diferenciam umas das outras pelo seu grau de esterificação. As pectinas além de apresentarem as vantagens inerentes aos biopolímeros ainda possuem um processo de extração relativamente simples, podendo ser obtidas de fontes vegetais como o bagaço da maçã, o maracujá e a polpa de beterraba (Thibault, 1980).

Os processos enzimáticos são extensamente estudados e na literatura é possível de se encontrar a descrição de inúmeros processos industriais que são conduzidos pela rota enzimática,

principalmente fazendo uso de enzimas imobilizadas (Tanaka, 1993). Com o objetivo de otimizar ainda mais tais processos é que se encontram os métodos de imobilização enzimática, porém o que é de importância para o presente estudo é a imobilização por formação de ligação covalente. Os processos de imobilização são vantajosos pois são capazes de conferir maiores estabilidade, seletividade e atividade à enzima (Mateo et al, 2007) e ao mesmo tempo são capazes de permitir a reutilização da enzima sem que a mesma perca atividade ao longo de vários ciclos (Hartmeier, 1985; Katchalski-Katzir, 1993; Sheldon, 2007), além disso a imobilização evita que o produto seja contaminado com enzimas.

Nesse estudo a enzima escolhida para ser imobilizada foi a Protease de *Bacillus amyloliquefaciens*, denominada comercialmente de Neutrase. Essa enzima tem sido usada em indústrias de panificação e de bebidas, além disso possui uma aplicação no ramo de engenharia genética onde é usada para preparo de extratos de DNA de células animais e vegetais

2. MÉTODOS

2.1. Extração de Pectina

Durante o processo de extração da pectina é necessário a produção de uma solução ácida. Nesse trabalho foram testadas duas soluções diferentes, uma solução de ácido nítrico 3% (v/v) e uma solução de ácido cítrico 6% (v/v). Utilizou-se farinha de maracujá comercial como matéria prima para extração do biopolímero.

Inicialmente, preparou-se uma solução de farinha de maracujá em solução ácida na concentração de 10% (m/v), essa solução foi então colocada em um banho térmico em uma temperatura de 80°C por um período de 1h. Essa solução foi então retirada do banho e colocada para descansar por um período suficiente para que ela retornasse a temperatura ambiente. Após esse tempo a solução foi filtrada para que se possa retirar o bagaço da farinha de maracujá. Ao filtrado foi adicionado etanol, num volume suficiente para que haja a precipitação na forma de gel. Esse gel foi seco com o auxílio de uma bomba de vácuo. Durante esse processo de secagem o material foi então lavado em alternância com metanol e acetona sucessivas vezes até que houvesse um clareamento do biopolímero para uma coloração bege bem clara. A pectina foi então guardada em freezer até sua utilização. Na imagem à esquerda da Figura 1 pode-se analisar a aparência da solução de farinha de maracujá e ácido nítrico.

2.2. Imobilização da Enzima Neutrase em Pectina

A imobilização da enzima neutrase em a pectina como suporte foi avaliada. Primeiramente o suporte foi tratado com glutaraldeído 25% (m/v). Uma massa de aproximadamente 3,5g de pectina foi depositada em um tubo falcon e a essa massa foram adicionados 35ml da solução de glutaraldeído. Esse falcon contendo o biopolímero e o glutaraldeído foram deixados em agitador rotativo por uma hora até que o processo de ativação do suporte pudesse ser concluído. Em seguida foi utilizado etanol

para fazer a precipitação da pectina que havia se dispersado na solução.

Dessa massa seca aproximadamente 3g de suporte foram utilizadas, para imobilização. A carga de proteína foi de 5mg de enzima para cada 1g de suporte. A imobilização foi conduzida contactando 30 mL de solução contendo enzima a pH 10,0 em tetraborato de potássio 100mM. O sistema foi mantido sob agitação (agitador rotativo) por um tempo de 16h. Após este tempo, uma amostra do sobrenadante foi retirada e então o derivado foi precipitado com etanol resfriado e passou pelo processo de secagem e estocagem para ser usado posteriormente.

2.3. Medida de Atividade

As medidas de atividade foram realizadas utilizando as alíquotas de sobrenadante retiradas no tempo zero e no tempo final de cada um dos ensaios de imobilização em pectina. Um volume de 3 ml de solução de caseína para cada uma das amostras que se tinha foi separado. Então a eles foi adicionado um volume de 0,6 ml de cada uma das alíquotas que haviam sido retiradas previamente. Esses sistemas são então colocados em um banho térmico a 50°C por um tempo de 10 minutos. Após decorrido o tempo especificado a reação foi parada com adição de 1,2 ml de uma solução de ácido tricloroacético 17,5%. O conteúdo de cada um dos tubos foi então centrifugado e então um volume de 1ml de sobrenadante de cada um deles foi retirado. A esse volume de sobrenadante foram adicionados 3ml de solução de carbonato de sódio e 1ml de solução do reagente de Folin- Ciocalteu. Esses tubos contendo esses componentes foram então agitado e deixados em descanso por 45 minutos. O último passo foi a leitura das absorbâncias dessas amostras seguido da realização de cálculos das concentrações de tirosina (produto).

Com os dados de atividade em mãos somos capazes de calcular os parâmetros de imobilização mais relevantes. Depois de medir a atividade inicial (At_i) e a final no sobrenadante e no branco, a atividade enzimática remanescente no sobrenadante pode ser calculada ($At_i - At_f$), com esses valores podemos calcular o rendimento de imobilização pela equação 1

$$R_{\text{mob}}(\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} * 100 \quad (1)$$

Em seguida temos a atividade recuperada. A atividade teórica (At_t) de neutralse imobilizada pode ser calculada usando a quantidade de enzima oferecida por grama de suporte (At_{of} - U/g suporte) e o rendimento de imobilização, como mostrado na equação 2. Após a medida de atividade real da enzima imobilizada (At_d - U/g suporte), usamos a fórmula 3 para fazer o cálculo da atividade recuperada.

$$At_t = IY * At_{of}, \quad (2)$$

$$At_r = \frac{At_d}{At_t} * 100, \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 contém duas imagens, uma representando a mistura de ácido nítrico e a farinha de maracujá e a outra mostrando o aspecto final da pectina extraída via ácido nítrico. A pectina extraída com o auxílio de ácido cítrico não demonstrou as mesmas características físicas, sendo que mesmo após um número similar de lavagens, se comparado com o ácido nítrico, o biopolímero continuou com uma coloração marrom, não chegando à coloração ideal para o mesmo. Mesmo assim, ambas foram utilizadas como suporte para imobilização de neutrase. A tabela 1 apresenta os resultados dos parâmetros de imobilização.



Figura 1 - Dispersão de farinha de maracujá e ácido nítrico (esquerda), pectina sendo seca após lavagens com metanol e acetona (direita).

Tabela 1 – Resultados do processo de imobilização

Tipo de Extração Pectina	Ativ. Inicial (U/mL)	Ativ. Reman.(U/mL)	Enz. Não Imob. (%)	Rendimento (%)	Ativ. Teórica (U/g)	Ativ. Derivado (U/g)	Ativ. Recuperada (%)
Ácido Nítrico	0,32	0,19	58,15	41,86	1,05	0,36	33,88
Ácido Cítrico	0,12	0,06	55,41	44,59	0,38	0,14	36,62

Portanto ao se analisar esses resultados que temos em mãos podemos constatar que o método utilizado na extração, ou seja, o uso de ácido cítrico ou ácido nítrico, não apresenta grande influência no processo de imobilização. Tendo em vista que os valores de rendimento de imobilização para os dois métodos não são expressivamente diferentes, mostrando então que a pectina extraída em ambos os métodos é capaz de imobilizar a enzima Neutrase.

Um fato que deve ser estudado mais a fundo segundo essa metodologia é a capacidade que o suporte tem de se dispersar em tampão tetraborato, tornando difícil o uso desse suporte em diversos processos reativos.

4.CONCLUSÃO

Através desse estudo pode-se notar que a pectina é um suporte promissor no processo de imobilização da Neutrase. Fomos capazes também de constatar que tanto a extração via ácido cítrico, quanto a extração via ácido nítrico oferecem rendimentos de imobilização similares, tendo em vista que a primeira obteve 44,59% e a segunda 41,85%. Isso mostra que ambas geram um suporte que apresenta as mesmas condições para o processo de imobilização via ligação covalente. Porém o método de extração via ácido nítrico gerou um suporte com características físicas que propiciam a imobilização.

5. REFERÊNCIAS

- Carpita, N.; McCann, M. - “*The cell wall*” in: Buchanan, B. B.; Gruissem, W. & Jones, R. L. (eds.), American Society of Plants Physiologists, Berkeley (2000).
- Chandra, R.; Rustgi, R. Biodegradable polymers. *Progr. Polym. Sci.* 1998, 23, 1273-1335.
- Hartmeier, W. Trends Biotechnol. 1985, 3, 149–153.
- Katchalski-Katzir, E. Trends Biotechnol. 1993, 11, 471–478.
- Kostal, Jan; Prabhukumar, Giridhar; Lao, U. Loi; Chen, Alin; Matsumoto, Mark; Mulchandani, Ashok; Chen, Wilfred *Journal of Nanoparticle Research*, v 7, n 4-5, p 517-523, October 2005
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Enzyme Microb. Technol. 2007, 40, 1451–1463.
- Pérez, S.; Rodríguez-Carvajal, M. A. & Doco, P.-Bioch., 85, p.109 (2003).
- Sheldon, R. A. Adv. Synth. Catal. 2007, 349, 1289–1307.
- Tanaka, A., Tosa, T., and Kobayashi, T. (1993) *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, Marcel Dekker, New York, NY.
- Tang, X.Z.; Kumar, P.; Alavi, S.; Sandeep, K.P. *S Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v 52, n 5, p 426-442, May 2012
- Thibault, J. F.-“*Les substances pectiques*”, in: Les polymeres vegetaux, Monties B. (ed.), Gauthier-Vilars, Paris (1980).
- Voragen, A. G. J.; Coenen, G.-J.; Verhoef, R. P. & Schols, H. A.-Struct. Chem, **20**, p.263 (2009). <http://dx.doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Voragen, G. J.; Pilnik, W.; Thibault, J. F.; Axelos, M. A. V. & Renard, C. M. G. C-“*Pectins*”, in: Food polysaccharides and their applications, cap. 10, Stephen A. M. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York (1995).