

ESTUDO DA TERMORRESISTÊNCIA DA PECTINASE COMERCIAL DE *Aspergillus niger* LIVRE E IMOBILIZADA EM ESPUMA RÍGIDA DE POLIURETANO

C. E. V. BUSTAMANTE^{1*}, P. TORMENN¹, T. PERTILE¹, E. MORESCO², G. TONIAZZO¹
e R. M. DALLAGO²

¹ Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões URI-Erechim, Departamento de Ciências Agrárias

² Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões URI-Erechim, Departamento de Ciências Exatas e da Terra

*E-mail para contato: cindyelena506@hotmail.com

RESUMO – Os processos biotecnológicos requerem enzimas estáveis sob as condições de estocagem e durante a aplicação industrial. Os estudos de termorresistência fornecem informações relacionadas à manutenção da capacidade catalíticas dos biocatalisadores, quando submetidos à ação de diversas temperaturas. Neste trabalho, foi avaliada a influência da temperatura (4°C, ambiente, 55°C e 80°C) sobre a atividade enzimática da pectinase comercial de *Aspergillus niger* na forma livre (líquida e liofilizada) e imobilizada *in situ* em espuma rígida de poliuretano (PU). As atividades pectinolíticas foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico na reação de hidrólise da pectina cítrica em condições ótimas de reação para cada derivado enzimático. Considerando como 100 % a atividade inicial, os resultados revelaram que, nas temperaturas e tempos avaliados, o derivado imobilizado mostrou-se muito mais resistente e estável em relação à forma livre. Os melhores resultados foram a 4°C para a pectinase imobilizada, a qual apresentou hiperativação da atividade enzimática, aumentando em 98 % a atividade inicial após 229 dias de estocagem e, também, a 80°C e 55°C onde a retenção da atividade inicial foi 28,7 % e 40 % após 3 e 44 dias de armazenamento, respectivamente. Atribuiu-se esse comportamento ao microambiente gerado dentro da rede polimérica que, provavelmente, protegeu a enzima da influência da temperatura e imitou os efeitos de aglomeração e confinamento em uma célula viva.

1. INTRODUÇÃO

As pectinases são um grupo complexo de enzimas que degradam as substâncias pécicas, até as unidades monoméricas básicas, hidrolisando as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica (Pedrolli *et al.*, 2009.; Uenojo e Pastore, 2007). Estas enzimas podem ser aplicadas em diversos processos biotecnológicos, especialmente, na produção de sucos de frutas nas etapas de filtração e clarificação, na elaboração de vinhos e nos processos de extração e maceração de frutas e vegetais (Jayani *et al.*, 2005). Os preparados comerciais de pectinases são, geralmente, comercializados na forma solúvel, apresentando problemas de aplicação como a instabilidade perante as mudanças na temperatura e das condições de processo, contaminação do produto pela presença do biocatalisador e impossibilidade da sua recuperação e reutilização (Seenuvasan *et al.*, 2013; Abdelmajeed *et al.*, 2012).

Com o intuito de minimizar tais inconvenientes surgiram as técnicas de imobilização enzimática, as quais melhoram o desempenho das enzimas nos processos catalíticos, devido à obtenção de derivados imobilizados com incremento na estabilidade enzimática, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas do biocatalisador, além de torná-los recuperáveis e reutilizáveis durante os ciclos catalíticos (Datta *et al.*, 2013). As enzimas podem ser imobilizadas sobre uma ampla variedade de suportes naturais ou sintéticos, a eleição do suporte e/ou a técnica depende da natureza da enzima, do substrato e da aplicação (Buga *et al.*, 2010). O poliuretano (PU) vem sendo utilizado como suporte para a imobilização de micro-organismos, enzimas e na concepção de biossensores analíticos. As propriedades únicas do PU merecem destaque especial, uma vez que esse material, além de ser de baixo custo, oferece vantagens na sua aplicação, tais como a alta resistência mecânica, a solventes e fatores ambientais (Nyari. 2013). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a termorresistência da pectinase comercial de *Aspergillus niger* livre (líquida e liofilizada) e imobilizado em espuma rígida de PU incubada às temperaturas de 4°C, ambiente (entre 10°C e 30°C), 55°C e 80°C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A pectinase comercial de *Aspergillus niger* (ROHAPECT® DA6L) utilizada para os experimentos de imobilização foi adquirida de AB Enzymes (Alemanha). Os precursores utilizados para a síntese da espuma rígida de PU foram o poliálcool e diisocianato. A pectina cítrica e o ácido α -D-galacturônico monohidratado foram adquiridos da Vetec (Brasil) e Sigma Aldrich (Suíça), respectivamente. Todos os demais reagentes utilizados durante o desenvolvimento deste estudo foram de grau analítico.

2.2 Liofilização da pectinase

30 mL da pectinase na forma líquida foram armazenados em freezer a – 80°C por 24 horas. Posteriormente, foram liofilizados em liofilizador Edwards ® modulyo 4K a uma pressão de vácuo de 0,1 mbar e temperaturas aproximadas de -50°C.

2.3 Imobilização da pectinase

A imobilização da pectinase foi realizada *in situ*, através da síntese da espuma de PU mediante a reação de polimerização dos monômeros poliálcool e diisocianato conforme o método adaptado de Silva *et al.* (2013). Para a imobilização, foram utilizados 0,2 g de enzima liofilizada e misturados com 3 mL de poliálcool. Após a solubilização foram adicionados 2 mL de diisocianato de modo a iniciar a reação de polimerização do PU (5 minutos). A espuma formada, contendo a enzima, foi deixada em repouso por 24 h para a sua completa solidificação. Posteriormente, foi fracionada e armazenada.

2.4 Atividade enzimática

Utilizando o método de Miller (1959) com algumas modificações, as atividades pectinolíticas foram determinadas nas condições otimizadas de reação da hidrólise do substrato pectina cítrica (0,7 % m/v) correspondente a 37°C e pH 3,4 para a pectinase livre (líquida e liofilizada) e 55°C e pH 4,5 para a pectinase imobilizada em PU. Uma unidade pectinolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido galacturônico por

minuto ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) sob as condições de ensaio. As atividades enzimáticas foram expressas em $U \cdot \text{mL}^{-1}$ para a pectinase líquida, $U \cdot \text{g}^{-1}$ de enzima para a liofilizada e para a imobilizada em $U \cdot \text{g}^{-1}$ de suporte.

2.5 Perfis de estabilidade térmica

Os perfis de estabilidade térmica da pectinase líquida, liofilizada e imobilizada em PU foram determinados mediante a incubação das amostras nas temperaturas de 4°C , ambiente (entre 10°C e 30°C) para fins de armazenamento e nas temperaturas de 55°C e 80°C para avaliar sua estabilidade na aplicação em processos industriais. Periodicamente, foi determinada a atividade residual, a qual foi calculada conforme a equação (1). Considerou-se como 100 % a atividade enzimática no tempo zero.

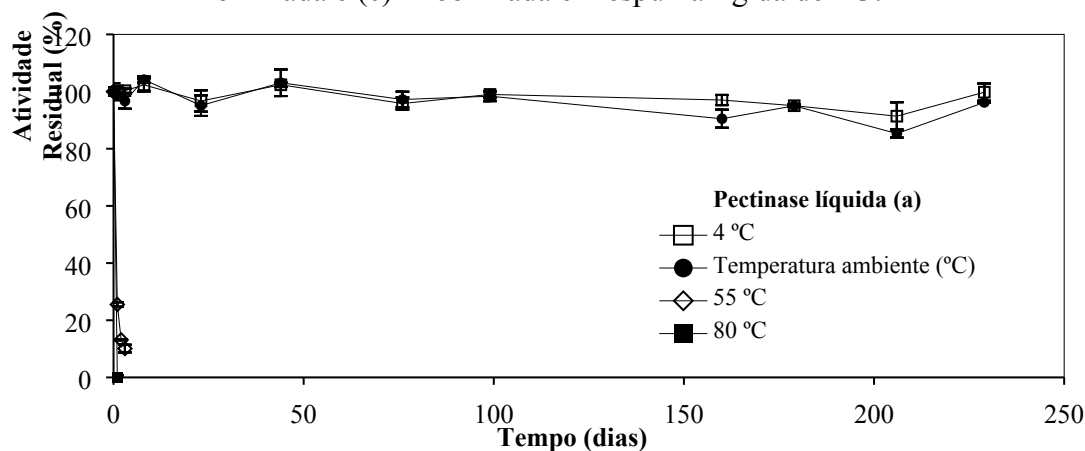
$$R (\%) = \frac{U_F}{U_I} \times 100 \quad (1)$$

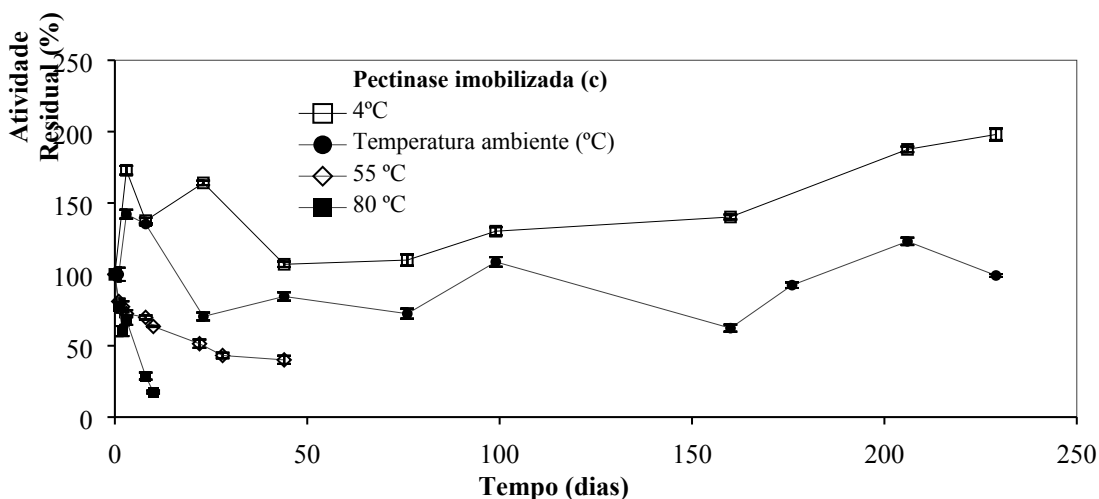
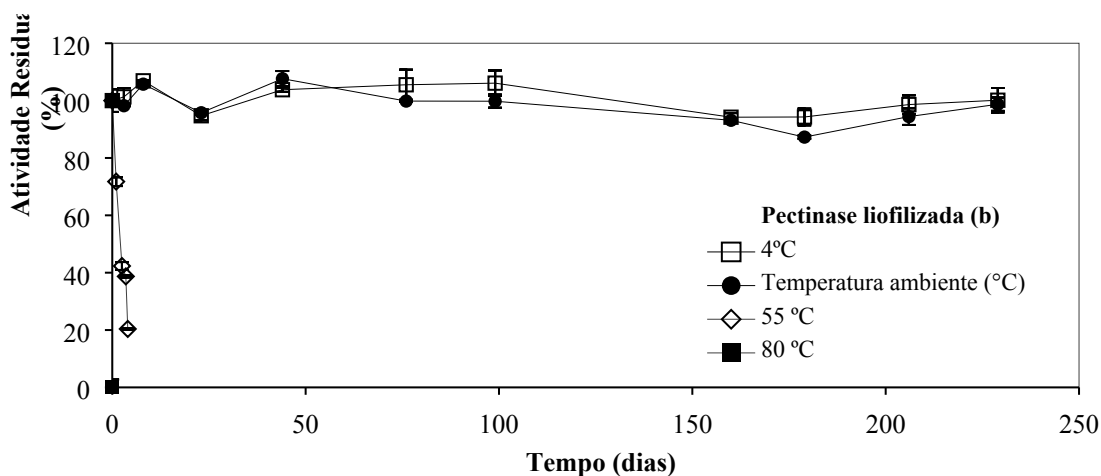
Sendo que: $R (\%)$ é a atividade residual, U_I e U_F correspondem à atividade inicial e após a incubação na temperatura avaliada, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de estabilidade térmica são de grande utilidade para avaliar o desempenho dos biocatalisadores sob as condições do processo, além de fornecer dados a respeito da vida útil, ou seja, por quanto tempo a enzima conservará sua capacidade catalítica quando submetida ao efeito de diferentes temperaturas. A termorresistência da pectinase comercial de *A. niger*, nas formas líquida, liofilizada e imobilizada em PU, foi avaliada mediante determinações periódicas das atividades enzimáticas, após a incubação nas temperaturas de 4°C , ambiente (entre 10°C e 30°C), 55°C e 80°C . Na Figura 1, estão dispostos os perfis de atividade residuais obtidos para a enzima livre e imobilizada durante o tempo avaliado.

Figura 1- Efeito da temperatura sobre a termorresistência da pectinase (a) líquida, (b) liofilizada e (c) imobilizada em espuma rígida de PU.





Considerando a atividade inicial como 100 %, os resultados mostraram que durante o período de incubação à temperatura de 4°C, não houve perda da atividade enzimática tanto para a pectinase livre quanto a imobilizada. Porém, observou-se que a enzima imobilizada apresentou hiperativação da atividade enzimática, obtendo-se 198 % de atividade residual após 229 dias (Figura 1c). A pectinase livre (Figura 1a e b) conservou 100 % da atividade inicial tanto na forma líquida quanto liofilizada.

Esses resultados sugerem que o suporte do PU fornece proteção à enzima do ambiente exterior, permitindo o aumento da atividade pectinolítica e, conseqüentemente, da estabilidade enzimática. Em enzimas imobilizadas essa tendência pode ser vinculada às melhoras no microambiente criado dentro do suporte, que minimiza a influência da temperatura e imita os efeitos de aglomeração e confinamento em uma célula viva (Zhang *et al.*, 2008). O uso de suportes hidrofóbicos, como o PU, é mais vantajoso para a conservação da capacidade catalítica das enzimas imobilizadas, uma vez que esses simulam o meio natural das enzimas e muitas vezes podem promover a hiperativação da atividade catalítica e o aumento da estabilidade, como decorrência da diminuição da retenção de água devida à hidrofobicidade do suporte, o que provavelmente minimiza os processos de desnaturação que estão relacionados à percentagem de hidratação das enzimas (Branco *et al.*, 2010.; Fernandez-

Lafuente *et al.*, 1998).

Após 229 dias de incubação na temperatura ambiente, corroborou-se que as pectinases líquida, liofilizada e imobilizada conservaram, concomitantemente, 96 %, 98 % e 99 % das suas atividades enzimáticas iniciais. Nos perfis de atividade residual obtidos nas temperaturas de 55°C e 80°C, observa-se que a pectinase imobilizada na espuma rígida de PU exibiu elevada estabilidade térmica quando comparada com as formas livres. O derivado imobilizado reteve 40 % e 28,7 % da atividade inicial após 44 e 3 dias de armazenamento nas temperaturas de 55°C e 80°C, respectivamente. Enquanto que a enzima livre, tanto líquida quanto liofilizada, foi inativada no primeiro dia de armazenamento a 80°C e, a 55°C conservou 10,1 % (líquida) e 20 % (liofilizada) da atividade inicial após a estocagem por 3 e 4 dias, respectivamente. Geralmente, a imobilização pode aumentar a rigidez da estrutura globular ativa das enzimas como consequência das interações multipontuais não covalentes entre a enzima e o suporte, por conseguinte, será necessária maior energia de ativação para rearranjar a conformação estrutural da enzima até uma organização molecular que permita a ligação do substrato ao sítio ativo, tornando a enzima mais resistente ao calor e a inativação (Wu *et al.*, 2014).

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a termorresistência da pectinase comercial de *Aspergillus niger* na forma líquida, liofilizada e imobilizada *in situ* na espuma rígida de PU. Constatou-se que o suporte de PU foi biocompatível com a pectinase, acarretando efeitos benéficos na estabilidade térmica, além de hiperativação a 4°C, e aumento da estabilidade térmica a 55°C e 80°C. Essa tendência foi vinculada ao microambiente criado dentro do suporte que protegeu a enzima do ambiente exterior e à rigidez molecular causada pela imobilização. Em geral, essas características fazem da pectinase imobilizada em PU um derivado com excelente potencial para ser utilizado na concepção de biorreatores e em diversas aplicações na indústria de alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

À URI-Erechim pela infraestrutura, a FAPERGS e a CAPES pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELMAJEED, N.; KHELI, O.; DANIAL, E. Immobilization technology for enhancing bioproducts industry. *Afr J Biotechnol.*, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.
- BRANCO, R.V.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G AND ALMEIDA, R.V. Immobilization and Characterization of a Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on Supports with Different Degrees of Hydrophobicity. *Enzyme Res.*, v. 2010, p. 1-8, 2010.
- BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). *Afr J Biotechnol.*, v. 9 n. 52, p. 8934-8943, 2010.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L.; RAJARAM, Y. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.*, v.3, p 1-9, 2013.

- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; G. FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids.*, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998.
- JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review, *Process Biochem.*, v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.*, v. 37, p. 426-428, 1959.
- NYARI, N. Estudo da imobilização de lipase *Candida antártica* B em poliuretano, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.
- PEDROLI, D.; MONTERIRO, A.; GOMES, E.; CARMONA, E. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol J.*, v. 3, p. 9-18, 2009.
- SEENUVASAN, M.; MALAR, C.; PREETHI, S.; BALAJI, N.; IYYAPPAN, J.; KUMAR, M.; KUMAR, K.; Immobilization of pectinase on co-precipitated magnetic nanoparticles for enhanced stability and activity. *Res. J. Biotechnol.*, v. 8, n. 5, p. 24-30, 2013.
- SILVA, M.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R.; HENRICK, P.; KUHN, G.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food Bioprod Process.*, v. 9, n. 1, p. 54-59, 2013.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. *Quím Nova.*, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.
- WU, R.; HE, B.; ZHAO, G.; LI, X. Immobilization of pectinase on polyethyleneimine-coated pulp fiber for treatment of whitewater from papermaking. *J Mol Catal B-Enzym.*, v. 99, p. 163-168, 2014.
- ZHANG, L.; JIANG, Y.; SHI, J.; SUN, X.; LI, J AND JIANG Z. Biomimetic polymer-inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation. *React Funct Polym.*, v. 68, p. 1507-1515, 2008.