

AValiação DA ESTABILIDADE TéRMICA DE PECTINASES COMERCIAIS IMOBILIZADAS E TRATADAS COM FLUIDO PRESSURIZADO

C. E. DEMAMAN ORO¹, I. GAIO¹, E. VALDUGA¹, A. FURIGO JR.², N. L. D. NYARI¹,
I. A. FERNANDES¹, A. M. GRABOSKI¹, N. A. DARONCH¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Faculdade de Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Alimentos
E-mail para contato: carolinae.oro@hotmail.com

RESUMO – Pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, insetos, nematódeos e plantas, a fim de degradar – para a obtenção de fonte de carbono, ou para modificar, fruto em amadurecimento – o heteropolissacarídeo pectina. A escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. As preocupações ambientais têm alertado a comunidade científica no sentido de investigar novas maneiras de diminuir o uso de solventes orgânicos voláteis. Para este efeito, o uso de fluidos supercríticos aparece como uma alternativa interessante. No presente estudo, a enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) foi submetida a tratamento com Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) e a sua estabilidade térmica foi medida. O trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica de pectinases comerciais imobilizadas e tratadas com fluido pressurizado.

1. INTRODUÇÃO

O termo geral "pectina" designa ácidos pectínicos solúveis em água, com quantidade variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições determinadas (SAKAI *et al.* 1993).

No presente estudo, a enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) foi investigada. Segundo Kashyap *et al.* (2001), a enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) pertence ao grupo das pectinases despolimerizantes, podendo ser a endo-PMGL ou endo-pectina liase (E.C.4.2.2.10), que hidrolisa as ligações glicosídicas entre resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação e/ou a exo-PMGL ou exo pectina liase, que hidrolisa a pectina, sequencialmente, por trans-eliminação.

A crescente ênfase no uso de biocatalisadores devido às suas propriedades favoráveis, tais como condições amenas e ambientalmente compatíveis de reação e sua alta especificidade, têm resultado num aumento do uso de enzimas imobilizadas, pois a interação

entre suporte e a enzima podem alterar favoravelmente as suas propriedades físicas e químicas (BASRI *et al.*, 1996).

As principais vantagens do GLP pressurizado com relação ao CO₂ supercrítico são: seu preço relativamente mais baixo; a observação de que os principais gases que o compõe, propano e n-butano, não apresentam efeito deletério na atividade da enzima, como acontece com o dióxido de carbono supercrítico (HABULIN; KNEZ, 2001), além da possibilidade de se operar em pressões mais baixas quando comparado com o CO₂.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica de pectinases comerciais imobilizadas e tratadas com fluido pressurizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enzimas

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*.

2.2. Reagentes

O gás liquefeito de petróleo foi fornecido pela Petrobras e é constituído por uma mistura de propano (50,3 %), n-butano (28,4 %), isobutano (13,7 %), etano (4,8 %) e outros componentes secundários (metano, pentano, isopentano, entre outros). Os demais reagentes empregados foram: Solução de Cloreto de Cálcio 75 mmol (CaCl₂); Solução Tampão de Oxalato de Sódio; Alginato de Sódio; Solução Tampão de Acetato de Sódio 100 mM, pH 4,5; Solução de Pectina 1,0% em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 4,5; Solução de Cloreto de Cálcio 0,01M (CaCl₂); Solução de Sulfato de Zinco hepta hidratado a 9% (ZnSO₄·7H₂O); Solução de Hidróxido de Sódio 0,5M (NaOH); Solução de Ácido Tiobarbitúrico 0,04M (C₄H₄N₂O₂S); Solução de Ácido Clorídrico 0,1M (HCl);

2.3. Imobilização da enzima em suporte gelatina-alginato

Na imobilização foi empregado gelatina e solução de CaCl₂, segundo metodologia 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 (~60°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 CaCl₂ 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 armazenada a 4°C em recipiente de plástico com tampa, este recipiente plástico com a enzima foi colocado dentro de um vidro com sílica gel.

2.4. Aparato experimental para tratamento da enzima em fluido pressurizado

O equipamento consiste basicamente de um reservatório de solvente, um banho termostático, uma bomba de seringa (ISCO 260 D), uma reator de aço inoxidável com um volume interno de 50 mL, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um programador portátil (Smar, HT201) com uma precisão de $\pm 0,4$ bar. O diagrama esquemático do equipamento é apresentado na Figura 1. Todas as linhas de montagem experimental empregaram tubulações de aço inoxidável com diâmetro externo 1/16" (HIP). Uma "check valve" (HIP 15-41AF1-T316SS) foi colocada entre a bomba e o reservatório de solvente para evitar o refluxo de solvente pressurizado.

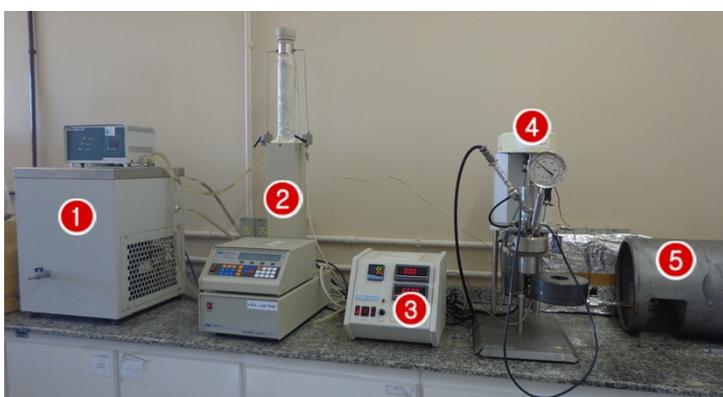


Figura 1- Aparato utilizado no tratamento das enzimas com o fluido pressurizado. 1- Banho Termostático; 2- Bomba de seringa; 3- Transdutor de pressão, temperatura e agitação; 4- Reator/célula de aço equipada com manômetro e manta de aquecimento; 5- Cilindro contendo gás GLP.

2.5. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática era determinada antes (atividade inicial) e após (atividade final) ao tratamento com fluido pressurizado. A atividade residual foi determinada de acordo com o exposto na Equação 1 e a Equação 2 refere-se as etapas de avaliação da estabilidade a diferentes temperaturas de armazenamento.

$$\text{Atividade residual(\%)} = \frac{\text{Atividade após pressurização}}{\text{Atividade antes da pressurização}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Atividade residual(\%)} = \frac{\text{Atividade após armazenamento}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (2)$$

A atividade da pectina liase 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 do 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 (Equação 3).

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\Delta \text{abs}}{0,01} \quad (3)$$

A Figura 2 abaixo mostra resumidamente como foi feita a medida da atividade enzimática.

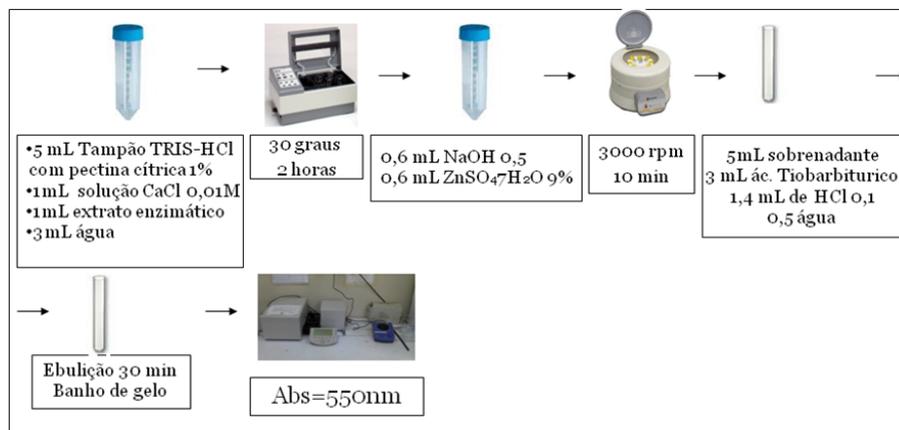


Figura 2- Esquema da determinação da atividade da enzima PMGL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3 mostra a estabilidade da enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® MASH imobilizada e pressurizada utilizando gás GLP (Pressão de 30 bar, tempo de 1 hora e taxa de despressurização de 100 bar/min).

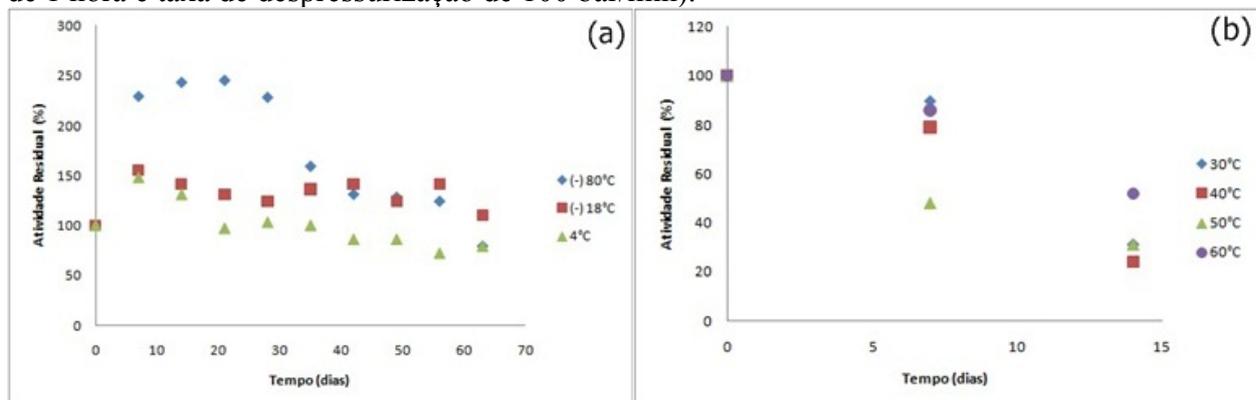


Figura 3- Estabilidade térmica da enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® MASH imobilizada e pressurizada utilizando GLP nas temperaturas baixas (a) e temperaturas altas (b).

Observa-se que a atividade residual apresentou um valor entre 103 a 245% para a enzima pressurizada e acondicionada nas temperaturas baixas (-80 a 4°C) durante os 28 primeiros dias, indicando desta forma um acréscimo de atividade em relação a atividade inicial e mantendo-se aproximadamente 70% da sua atividade residual por cerca de 63 dias. Porém, quando a mesma enzima foi armazenada em temperaturas altas (30 a 60°C) mostrou um efeito contrário se comparado ao resultado obtido pela enzima apenas imobilizada, no qual a atividade residual foi de 88% em 21 dias na temperatura de 40°C, enquanto que a enzima imobilizada e tratada com GLP aos 14 dias mostrou atividade máxima de 52% para a temperatura de 60°C (Figura 3b). Ou seja, pode-se inferir que o tratamento com GLP apresentou um efeito negativo na estabilidade desta enzima.

A estabilidade térmica para a enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® Ultra SP-L imobilizada e pressurizada (Pressão de 190 bar, tempo de 1 hora e taxa de despressurização de 20 bar/min) utilizando GLP é apresentada na Figura 4.

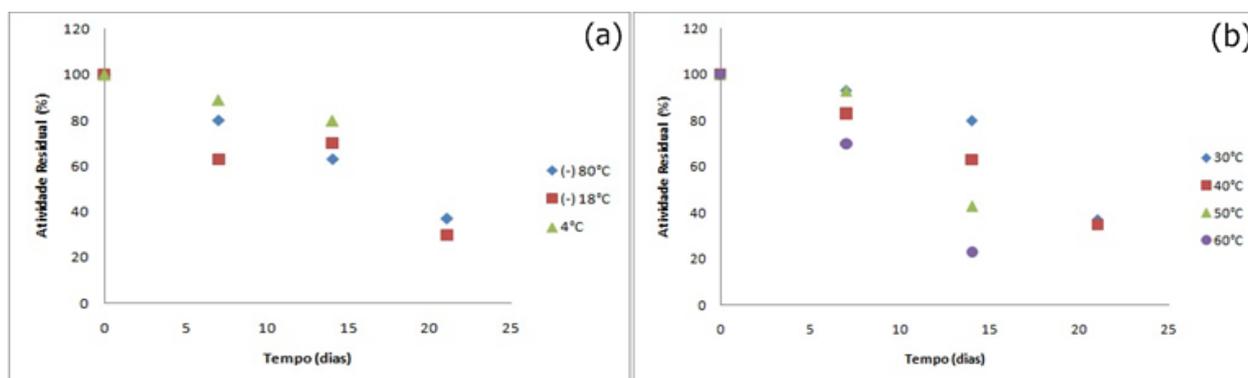


Figura 4- Estabilidade térmica para a enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® Ultra SP-L imobilizada e pressurizada utilizando GLP nas temperaturas baixas (a) e temperaturas altas (b).

A estabilidade térmica nas baixas temperaturas (Figura 4a), foi de aproximadamente 50% da sua atividade inicial aos 14 dias para a polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® Ultra SP-L imobilizada e pressurizada utilizando GLP. Esta enzima em particular mostrou-se mais frágil quando comparada a enzima Pectinex® MASH (Figura 3).

A termoestabilidade de uma enzima refere-se tanto à termoestabilidade dinâmica e quanto à estabilidade cinética. A termoestabilidade dinâmica (T_m) representa 50% da enzima desdobrada e a termoestabilidade cinética reflete a meia vida ($T_{1/2}$) da enzima, a uma determinada temperatura. Essa termoestabilidade está diretamente associada ao dobramento da proteína, o qual é estabilizado por equilíbrio entre forças de dobramento e de desdobramento (energia de estabilização da enzima ΔG_{stab}) que é representado por $\Delta G_{stab} = \Delta H_{stab} - T \cdot \Delta S_{stab}$, onde ΔH = entalpia de estabilização (dobrado) e ΔS = entropia (desdobrado) (SARABOJI, *et al.*, 2005).

A proteína nativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra (ANFENSEN, 1973).

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica de pectinases comerciais imobilizadas e tratadas com fluido pressurizado. A enzima polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® MASH mostrou ótimos resultados quando imobilizada com gelatina-alginato para todas as temperaturas propostas. Quando a enzima imobilizada foi tratada com gás GLP observou-se um efeito contrário para a estabilidade em altas temperaturas. Isso pode estar associado ao desdobramento da proteína, mas são necessários estudos mais aprofundados do efeito do GLP sobre a enzima. A polimetilgalacturonato liase (PMGL) Pectinex® Ultra SP-L obteve um aumento na sua atividade residual para as altas temperaturas.

Como foi observado, é preciso um estudo mais aprofundado sobre os efeitos do gás GLP sobre a atividade das enzimas pectínicas.

6. REFERÊNCIAS

ANFENSEN, C. B.; Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181. 223-230. (Nobel Lecture), 1973.

BASRI, M.; YUNUS, W.Z.W.; YOONG, W.S.; AMPON, K.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1996: v.6: 169-173.

HABULIN, M.; KNEZ, Z. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 76, p. 1260-1266, 2001.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77:215-227.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39: 213-294.

SARABOJI, K.; GROMINHA, M. M.; Ponuswany, M. N.; *International Journal of Biological Macromolecules* . 2005, 35, 211.