

Área: Engenharia de Alimentos

REUTILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 IMOBILIZADO EM MATRIZ BIOMIMÉTICA POLIMÉRICA-INORGÂNICA

Cindy Elena Bustamante Vargas^{1*}, Eunice Valduga¹, Geciane Toniazzo¹ e Rogério
Marcos Dallago¹

¹ Departamento de Ciências Agrárias, programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI-Erechim), Erechim, RS.

*E-mail: cindyelena506@hotmail.com

RESUMO – As técnicas de imobilização enzimática permitem obter biocatalisadores com melhoras significativas na sua estabilidade operacional, além de possibilitar sua recuperação e reutilização. O extrato enzimático pectinolítico de *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi imobilizado por encapsulamento na matriz biomimética polimérica-inorgânica de alginato-gelatina-oxalato de cálcio (AGOCa) e nas matrizes controle de alginato-oxalato de cálcio (AOxal) e alginato-água (ACa). A atividade enzimática de Exo-poligalacturonase (Exo-PG) dos imobilizados foi determinada utilizando pectina cítrica como substrato. A avaliação do reúso demonstrou que o extrato pectinolítico imobilizado na matriz híbrida de AGOCa manteve 56,33 % de sua atividade inicial até o 9º ciclo, já quando imobilizado nas matrizes controle de AOxal e ACa, 50,63 % e 57,6 % das suas atividades iniciais foram mantidas nos 7º ciclo e 6º ciclo, respectivamente.

Palavras-chave: Imobilização; extrato pectinolítico; reúso, alginato-gelatina; *Aspergillus niger* ATCC 9642.

1 INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas que hidrolisam as substâncias pécnicas e na indústria de alimentos, utilizam-se comumente para a clarificação e aumentar o rendimento da produção de sucos, produção de vinhos e nos processos de extração e maceração de frutas e vegetais (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013; SEMENOVA *et al.*, 2006; JAYANI *et al.*, 2005).

Apesar das vantagens dos catalisadores biológicos, estes geralmente são vendidos na forma solúvel, apresentando problemas de aplicação tais como: instabilidade de alguns deles nas condições do processo, queda da atividade durante as reações, contaminação do produto final pela presença do catalisador em solução, dificuldade da sua eliminação da mistura de reação e à impossibilidade da sua recuperação e reutilização (ARROYO, 1998).

Frente a isso, as técnicas de imobilização de enzimas surgiram como alternativa para solucionar tais inconvenientes. As técnicas de imobilização por encapsulamento são especialmente desenhadas para restringir a mobilidade das moléculas de enzima, atingindo-se um efeito benéfico na estabilidade em comparação com a sua forma solúvel, além de permitir a separação do meio reacional e sua reutilização (GOMES *et al.*, 2006; DATTA *et al.*, 2013). O método de imobilização baseado na geleificação iônica utiliza principalmente alginato como componente da membrana e a combinação de íons bivalentes como o cálcio para induzir a geleificação, conseguindo-se que as enzimas fiquem livres em solução, mas tenham restrito seus movimentos pela estrutura reticular do gel, permitindo que a difusão do substrato e produtos se dê através da membrana porosa formada (ABDELMAJEED *et al.*, 2012).

Os materiais híbridos poliméricos-inorgânicos obtidos através da técnica de mineralização biomimética são considerados como a próxima geração de matrizes para a imobilização de enzimas, uma vez que proporcionam ambientes biocompatíveis para o encapsulamento e estabilização das enzimas, além de ser uma metodologia simples e fácil (LU *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2011).

Neste sentido, o objetivo principal do trabalho foi avaliar a reutilização do extrato enzimático pectinolítico de *Aspergillus niger* ATCC 9642 imobilizado em matriz biomimética polimérica-inorgânica de alginato-gelatina-oxalato de cálcio (AGOCa) e nas matrizes controle de alginato-oxalato de cálcio (AOxal) e alginato-água (ACa).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução do extrato enzimático pectinolítico

O extrato enzimático bruto pectinolítico foi obtido mediante fermentação submersa, segundo a metodologia otimizada descrita por Gomes *et al.* (2011). Foi utilizado um meio sintético otimizado constituído de 32g/L de pectina cítrica, 2 g/L de L- asparagina, 0,06 g/L de fosfato de potássio, 1,0 g/L de sulfato de ferro. A concentração de esporos utilizada foi de 5×10^6 esporos/mL. As condições empregadas para a bioprodução foram: 180 rpm, 30°C, pH inicial de 5,5 e tempo de 24 horas.

2.2 Atividade Exo-poligalacturonásica (Exo-PG) do extrato pectinolítico imobilizado

A atividade de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico imobilizado foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores segundo Miller (1959), com algumas modificações. Uma unidade pectinolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$). As atividades do extrato pectinolítico imobilizado foram expressas em unidades de atividade por g (U/g).

2.3 Imobilização do extrato bruto pectinolítico

A imobilização do extrato enzimático pectinolítico foi realizada segundo a metodologia de Shen *et al.* (2011) com modificações. Alginato de sódio 2 % (p/v) foi suspenso em um proporção 3:10 (v/v) de extrato enzimático/tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5). O gel obtido foi gotejado em uma solução de CaCl₂ (75 mM) e gelatina até uma concentração final de 1 % (p/v) mantida sob agitação constante. Durante 10 minutos as esferas permaneceram na solução de CaCl₂ e gelatina, posteriormente, foram lavadas com 100 mL de água destilada e 100 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5). Para a formação das matrizes controle de AOxal e Aca, seguiu-se o mesmo procedimento, com a diferença que para dissolver o alginato de sódio foi utilizado o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) e água destilada, respectivamente, e a solução de CaCl₂ (75 mM) não continha gelatina.

2.4 Reúso

As esferas do extrato pectinolítico imobilizado foram usadas sucessivamente em diferentes ciclos de reações. A atividade de Exo-PG da primeira reação foi considerada como 100%. Após cada um dos ciclos, as esferas contendo o extrato enzimático foram removidas do meio reacional, lavadas com água destilada e solução tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 5,5). Após a remoção do excesso de solução aquosa, com o auxílio de bomba a vácuo (Tecnal TE-085), foi realizada a dosagem de atividade de Exo-PG empregando a metodologia descrita no item 2.2. A equação 1 fornece o cálculo para a atividade relativa (RA) de cada ciclo.

$$RA (\%) = \frac{\text{Atividade de Exo-PG do extrato no ciclo } n}{\text{Atividade de Exo-PG do extrato no ciclo } 1} \times 100 \quad (1)$$

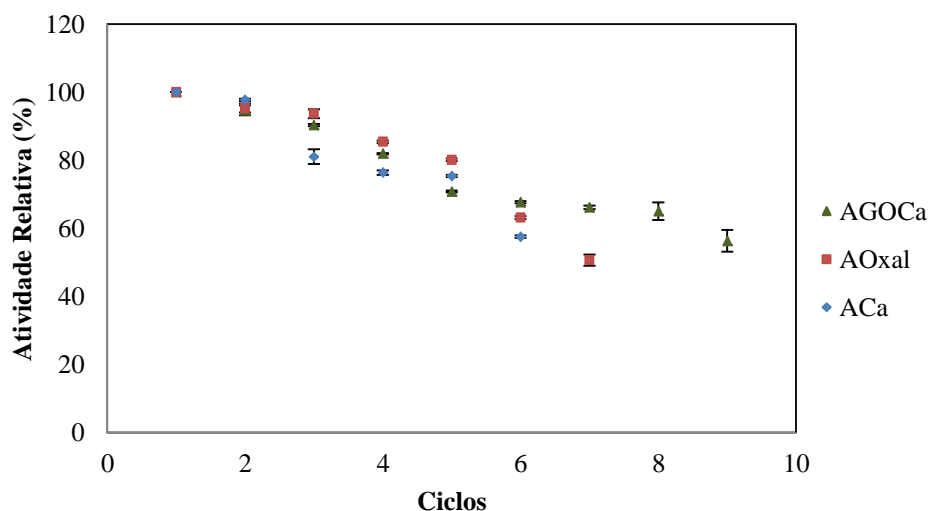
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O maior interesse ao imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador que possa ser reutilizado no processo catalítico. Ao longo dos reúsos, é comum obter diminuição da atividade enzimática. Esta queda deve ser quantificada para determinar o número máximo de vezes que a enzima imobilizada pode ser utilizada, sem afetar significativamente a produtividade do processo (KEMPKA, 2012). A Figura 1 mostra os perfis de atividade relativa (%) obtidos para o extrato enzimático pectinolítico obtido de *A. niger* ATCC 9642 em relação ao reuso.

Observa-se uma perda gradativa da atividade relativa ao longo do reuso, sendo que o extrato enzimático imobilizado em AGOCa apresentou os melhores resultados, permitindo um maior número de reutilizações em comparação com as matrizes controle, mantendo 56,3 % de sua atividade inicial no 9º ciclo. Quando imobilizado nas matrizes controle de AOxal e Aca obteve-se 50,63 % e 57,6 % das suas atividades iniciais mantidas até o 7º e 6º ciclo, respectivamente. A perda de atividade relativa pode ser explicada pela inativação da enzima em

virtude da desnaturação proteica (KEPMKA, 2012). Geralmente enzimas encapsuladas em alginato de cálcio, têm diminuição da sua atividade após seu uso em diferentes ciclos catalíticos, devido à liberação da enzima do suporte como resultado da lavagem das esferas no final de cada ciclo, além de mudanças conformacionais e ao dano mecânico das esferas depois de ser utilizadas repetidas vezes (REHMAN *et al.*, 2013; WON *et al.*, 2005).

Figura 1. Reúso do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa.



Buga *et al.* (2010) estudaram o reúso da poligalacturonase de *A. niger* (SA6) imobilizada em alginato de cálcio e determinaram que após três ciclos, esta conserva 14,8 % da sua atividade catalítica inicial. Segundo os autores, a redução da atividade pode ser devida à inativação pelo calor e à perda gradual da atividade devido à fuga de enzima ao meio reacional.

Saxena *et al.* (2008) obtiveram 50 % de perda da atividade relativa após três ciclos de reúso da poligalacturonase de *A. niger* Van Tieghem (MTCC 3323) imobilizada em suporte ativado de polietileno, enquanto, Rao *et al.* (2000) relataram uma retenção de 28 % da atividade de uma Endo-poligalacturonase, obtida a partir de *A. ustus*, imobilizada, após ser utilizada por 10 ciclos.

Valores de atividade residual nos reúsos de pectinases também são reportados na literatura. Csanádi e Sisak, (2006) ao avaliarem o reúso da enzima Pectinex Ultra SP-L imobilizada em resina de Amberlite IRA900 Cl, determinaram que o imobilizado pode ser usado por 12 ciclos consecutivos para a produção de fruto-oligossacarídeos. Li *et al.* (2008) estudaram a imobilização de pectinase comercial em suporte ativado de ágar-gel e encontraram que a enzima imobilizada matem 81 % de atividade residual após 10 ciclos de reação.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a reutilização do extrato bruto pectinolítico de *Aspergillus niger* ATCC 9642 imobilizado em matriz biomimética polimérica-inorgânica de AGOCa e nas matrizes controle de AOxal e ACa. Evidenciou-se que o extrato enzimático quando imobilizado na matriz AGOCa pode ser reutilizado um maior número de vezes se comparado com o imobilizado nas matrizes controle de AOxal e ACa. Isto provavelmente é devido à maior estabilidade térmica e mecânica fornecida pela matriz polimérica de AGOCa ao extrato enzimático pectinolítico, pela formação da camada inorgânica de oxalato cálcio ao redor das esferas de alginato de cálcio.

5 AGRADECIMENTOS

À URI – Erechim, FAPERGS, CAPES e ao CNPq pela infra-estrutura e suporte financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- ABDELMAJEED, N.; KHELI, O.; DANIAL, E. Immobilization technology for enhancing bio-products industry, **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.
- ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones, **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. n, p. 23-29, 1998.
- BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6), **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 52, p. 8934-8943, 2010.
- CSANÁDI, Z.; SISAK, C. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L pectinase and its application to production of fructooligosaccharides, **Acta Alimentaria**, v. 35, n. 2, p. 205–212, 2006.
- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642, **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 281-287, 2011.
- JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.
- JEGANNATHAN, K.; NIELSEN, P. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review, **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228 – 240, 2013.
- KEMPKA, A. **Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes blooms adicionada de plastificantes hidrofílicos**, 2012 – Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- LI, T.; LI, S.; WANG, N.; TAIN, L. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support, **Food Chemistry**, v. p. 109 703–708, 2008.
- LU, Z.; ZHANG, J.; MA, Y.; SONG, S.; GU, W. Biomimetic mineralization of calcium carbonate/carboxymethylcellulose, **Materials Science and Engineering**, v. 32, p. 1982–1987, 2012.

- MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 37, p. 426–428, 1959.
- RAO, N.; KEMBHAVI, A.; PANT, A. Immobilization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus ustus* on silica gel, **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1557–1559, 2000.
- REHAM, H.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S.; MOLINARO, A. ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support, **Food Chemistry**, v. 139, p. 1081–1086, 2013.
- SAXENA, S.; SHUKLA, S.; THAKUR, A.; GUPTA, R. Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification, **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.55, n.1, p. 33–51, 2008.
- SEMENOVA, M.; SINITSYNA, O.; MOROZOVA, V.; FEDOROVA, E.; GUSAKOV, A.; OKUNEV, O.; SOKOLOVA, L.; KOSHELEV, A.; BUBNOVA, T.; VINETSKII, Y.; SINITSYN, P. Use of preparation from fungal pectin lyase in the food industry, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 598-602, 2006.
- SHEN, Q.; YANGA, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1565–1571, 2011.
- WON, K.; SANGBUM, K.; KWANG-JE, K; HONG, P.; SANG-JI, M. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel bead, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2149-2154, 2005.