

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Caracterização parcial da poligalacturonase de *Aspergillus niger* ATCC 9642 imobilizada em espuma flexível de poliuretano

Scherer G. C. R. S<sup>1</sup>, Melo R. N<sup>1</sup>, Valduga E<sup>1</sup>, Backes G. T<sup>1</sup>, Malvessi E<sup>2</sup>, Leal I. C. R<sup>3</sup>,  
Zeni. J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI- Erechim - Engenharia de Alimentos  
CEP – 97000-000, Erechim – RS - E-mail: jamilezeni@uricer.edu.br

<sup>2</sup>Universidade de Caxias do Sul - UCS- Caxias do Sul- Engenharia de Alimentos- CEP 95070-560 - Caxias do  
Sul- RS

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ-Faculdade de Farmácia- Ilha do Fundão, CEP – 21941-902, Rio  
de Janeiro – RJ

#### RESUMO

*O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar parcialmente a poligalacturonase de Aspergillus niger ATCC 9642 imobilizada em poliuretano. Para este efeito, empregou-se um planejamento fatorial completo. Para avaliar a temperatura e pH ótimos da enzima PMGL empregou-se um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, onde a temperatura variou de 30-80°C e o pH de 3-6. A máxima atividade de poligalacturonase produzida em meio sintético (32 g/L de pectina cítrica (VETEC), 2 g/L de L-asparagina, 0,06 g/L de fosfato de potássio, 1,0 g/L de sulfato de ferro, 180 rpm 30 °C, pH inicial de 5,5 e 48 horas de fermentação) foi de 154 U/g em pH 6,0 e 55°C.*

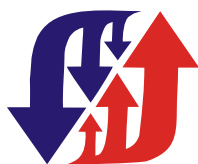
**Palavras chave:** imobilização, poligalacturonase, caracterização parcial.

#### INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas pectinolíticas utilizadas na indústria de alimentos, química, biocombustível e têxtil destaca-se a endo e exo-PG (poligalacturonase), PME (pectinametilesterase) e PMGL (pectina liase) produzidas por micro-organismos utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. As pectinases auxiliam no processo de extração, filtração, clarificação e aumento do rendimento de produtos como café, chá e óleo. Também podem ser utilizadas no processo de degomagem de fibras (algodão, rami, juta e linho) e na indústria de papel e celulose (UENOJO e PASTORE, 2007).

Porém, apesar da vasta aplicação destas enzimas, o seu uso não é generalizado nos processos industriais devido a maior parte delas não apresentarem estabilidades nas condições do processo. Além disso, a sua implantação como catalisadores em processos químicos em grande escala tem apresentado difícil controle dos processos de catálises homogênea: o alto custo do extrato enzimático, a perda de atividade durante as reações, a contaminação do produto final pela presença do catalisador em solução, a dificuldade de sua eliminação da mistura de reação e à impossibilidade de a sua reutilização (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Frente a isto, a imobilização de enzimas tem surgido como uma alternativa para solucionar estes inconvenientes, assim, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização, permitindo que o processo biotecnológico seja economicamente viável (DALLA-



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

VECCHIA et al., 2004). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo imobilizar *in situ* a poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em espuma flexível de poliuretano e caracterizar enzima imobilizada em termos de temperatura e pH ótimos.

### MATERIAL E MÉTODO

#### Bioprodução

Para a bioprodução da poligalacturonase (PG) foi utilizado o meio composto por 32 g/L de pectina cítrica (VETEC), 2 g/L de L-asparagina, 0,06 g/L de fosfato de potássio, 1,0 g/L de sulfato de ferro, 180 rpm 25°C, pH inicial de 4,0,  $5 \times 10^6$  esporos/mL, e 27 horas de fermentação (Gomes et al., 2011).

#### Avaliação da temperatura e pH ótimos

Para avaliar a temperatura e pH ótimos das enzimas PG empregou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$ , sendo que os níveis das variáveis encontram-se descritos na Tabela 1, respectivamente.

**Tabela 1** - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo  $2^2$  de temperatura e pH ótimos da enzima PG imobilizada em poliuretano.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
pH	X <sub>1</sub>	3	3,5	4,5	5,5	6
Temperatura (°C)	X <sub>2</sub>	30	37	55	73	80

#### Atividade de poligalacturonase

A atividade pectinolítica da poligalacturonase imobilizada (PG) será determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1956).

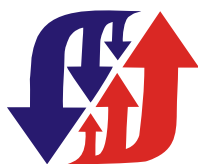
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### Temperatura e pH ótimos

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  (3 pontos centrais), e os resultados da atividade enzimática da poligalacturonase, na qual observa-se que a maior atividade foi de 154 U/g (Ensaio 6) em pH 6,0 e 55°C.

**Tabela 2** - Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  com valores codificados (reais) e resposta em atividade enzimática de poligalacturonase.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Respostas PG (U/g)
	pH X <sub>1</sub>	Temperatura (°C) X <sub>2</sub>	
1	-1 (3,4)	-1 (37)	16,57
2	1 (5,5)	-1 (37)	112,81
3	-1 (3,4)	1 (73)	23,88



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

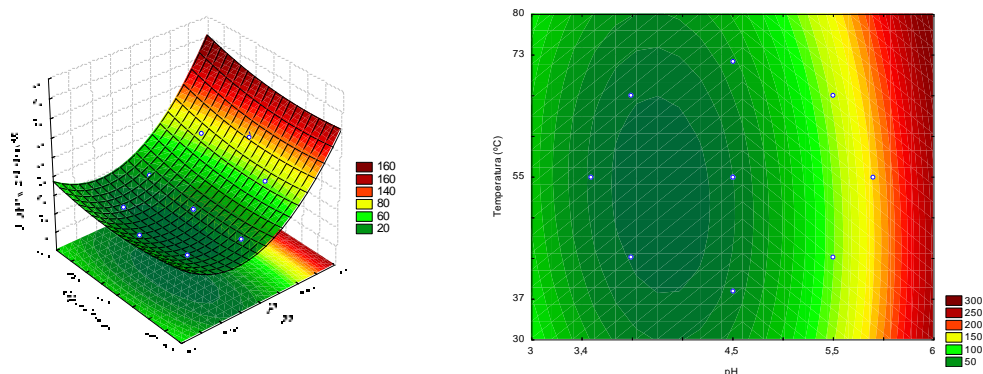
4	1 (5,5)	1 (73)	132,19
5	-1,41 (3)	0 (55)	29,74
6	1,41 (6)	0 (55)	154,00
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	32,81
8	0 (4,5)	1,41 (80)	40,65
9	0 (4,5)	0 (55)	29,00
10	0 (4,5)	0 (55)	29,00
11	0 (4,5)	0 (55)	29,50

Os dados da Tabela 2 foram tratados estatisticamente onde observou-se que as variáveis pH e temperatura mostraram uma influência positiva ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade da poligalacturonase. A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade da PG em função das variáveis analisadas (pH e temperatura), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,99 e o F calculado 21,79 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 1.

$$PG = 29,14 + 95,22X_1 + 66,55X_1^2 + 9,46X_2 + 11,08X_2^2 + 6,03X_1X_2 \quad (\text{Eq. 1})$$

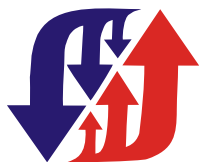
Onde: PG = Atividade de PG (U/g);  $X_1$  = pH e  $X_2$  = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

A Figura 1 apresenta o comportamento da atividade de poligalacturonase em função das variáveis analisadas, onde podemos observar que próximo ao pH 6 teremos as maiores atividades, sendo que a temperatura da quantificação enzimática não demonstra grande influência.



**Figura 1** - Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de poligalacturonase (U/g) em função do pH e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Bustos *et al.* (2010), ao imobilizar Poligalacturonase (PG) sobre esferas de polimetacrilato-divinilbenceno (PM-DVB), obtiveram resultado semelhante ao do presente



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

estudo, onde a PG imobilizada reteve aproximadamente 70,5 % da sua atividade após dois meses de armazenamento. Bampi (2010) estudou a imobilização da Poligalacturonase (pectinase) de *Penicillium brasilianum* em suporte de alginato-carvão e observou que, uma queda de atividade de mais de 50 % após 67 h de armazenamento a 4°C.

Reham *et al.* (2013) utilizaram alginato de cálcio como suporte para a imobilização de pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 e encontraram que a imobilização incrementa o tempo ótimo de reação para a degradação de pectina de 5 a 10 min e a temperatura de 45 a 55°C, se comparada com a enzima livre, no entanto reportaram pH ótimo de 7 tanto para a enzima livre quanto imobilizada.

### CONCLUSÕES

A maior atividade enzimática de poligalacturonase imobilizada *in situ* em espuma flexível de poliuretano foi de 154 U/g com pH 6,0 e temperatura de 55°C.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a URI Erechim, CAPES, CNPq e FAPERGS pela infraestrutura e apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAMPI, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. 2010. *Estudo da imobilização e caracterização de poligalacturonase*.
- BUSTOS, M.; ORTEGA, N.; PILAR-IZQUIERDO, M.; PALACIOS, D.; PEREZ-MATEOS, M, 2010. *Journal of Biotechnology (Special Abstracts)*, v. 150S, p. S301-S302.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO M e SOLDI V, 2004. *Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros*, Química Nova, v. 27, n 4, p. 623-630.
- ESAWY, M.; GAMAL, A.; KAMEL, Z.; ISMAIL, A.; ABDEL-FATTAH, A, 2013. *Evaluation of free and immobilized Aspergillus niger NRC1ami pectinase applicable in industrial processes*, Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 1463– 1469.
- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. 2011. *Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by Aspergillus niger ATCC 9642*. Food and Bioproducts Processing, v. 89, p. 281–287.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination or reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, v.31, n.3, p. 426-428.
- REHAM, H.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S.; MOLINARO, A. ANSARI, A. , 2013. *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.
- SHUKLA, S.; SAXENA, S.; THAKUR, J AND GUPTA, R. , 2010. *Immobilization of polygalacturonase from Aspergillus niger onto glutaraldehyde activated nylon-6 and its application in apple juice clarification*, Acta Alimentaria, v. 39, n. 3, p. 277–292.
- UENOJO, M.; PASTORE, G.M. 2007. *Pectinases: aplicações industriais e perspectivas*. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil,