

Hidrólise ácida e enzimática de pectina para crescimento celular de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*

LOCATELLI, Gabriel Olivo*; SILVA, Gabriella Dias da**; FINKLER, Leandro**; FINKLER, Christine Lamenha Luna***

Resumo

Substâncias pécicas são encontradas em grandes quantidades nos resíduos da industrialização de sucos de frutas. Esses compostos são susceptíveis à hidrólise por métodos ácidos e enzimáticos, podendo ser empregados como substratos de baixo custo em processos de conversão biológica para obtenção de bioprodutos, como os biopolímeros. *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida* são micro-organismos conhecidos por sua capacidade de acumular poli-hidroxicanoatos (PHAs) como fonte de carbono e energia, em condições desfavoráveis de crescimento e excesso de fonte de carbono. Foram estudadas as hidrólises ácida e enzimática de uma pectina comercial, e os hidrolisados foram empregados como substrato para crescimento celular de ambos os micro-organismos. O substrato obtido por hidrólise ácida, realizada em sistema de rotaevaporador com refluxo, permitiu o crescimento celular de *C. necator* após uma fase adaptativa de 12 horas. Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com a enzima poligalacturonase utilizando-se a pectina esterificada e não esterificada como substrato, obtendo-se ao final de 24 horas mais de 5 g/L de redutores. O hidrolisado obtido permitiu apenas o crescimento celular de *C. necator*, após uma fase adaptativa de 8 horas, enquanto *P. putida* não apresentou crescimento celular em nenhuma das condições de hidrólise avaliadas.

Palavras-chave: Pectina. Hidrólise. Poligalacturonase. Poli-hidroxicanoatos.

Acid and enzymatic hydrolysis of pectin for cell growth of Cupriavidus necator and Pseudomonas putida

Abstract

Pectin is found in large amounts as waste of industrialized fruit juices. These pectic substances are susceptible to hydrolysis by acid and enzymatic methods, and could be used as low-cost substrates on biological conversion processes for obtaining bioproducts, such as biopolymers. Cupriavidus necator and Pseudomonas putida are microorganisms known for their

* Universidade Federal de Pernambuco; Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial; Departamento de Antibióticos; Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50670-901; gabriel_locatelli@hotmail.com; chrislluna@yahoo.com.br

** Universidade Federal de Pernambuco; Centro Acadêmico de Vitória, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil, 55608-680; gab.diaass@hotmail.com; leandro.finkler@gmail.com; chrislluna@yahoo.com.br

ability to accumulate polyhydroxyalkanoates (PHAs) as carbon and energy sources in unfavorable conditions of growth and excess carbon source. In this work were investigated acid and enzymatic hydrolysis of commercial pectin aiming the use pectic hydrolysates as substrates for cell growth of both microorganisms. Substrate obtained by acid hydrolysis, held in rotaevaporator system with reflux, allowed cell growth of *C. necator* with adaptive phase of 12 hours. Enzymatic hydrolysis assays using polygalacturonase, performed on esterified and non-esterified pectin, allowed obtaining a reducing groups concentration above 5 g/l after 24 h. Hydrolysate obtained allowed only the cell growth of *C. necator* after an adaptive phase of 8 hours, while *P. putida* cell growth was inhibited in all of hydrolysis conditions tested.

Keywords: Pectin. Hydrolysis. Polygalacturonase. Polyhydroxyalkanoates.

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de materiais plásticos revolucionou a indústria e a sociedade, tornando-se cada vez mais presente em nosso dia a dia. Sua aplicação em materiais de rápida circulação, aliada ao descarte inadequado, fez de uma de suas principais características – durabilidade – a grande causadora de graves danos ambientais. Em decorrência disso, tem aumentado a conscientização global da sociedade pela minimização dos resíduos gerados; em contrapartida, a comunidade científica busca alternativas tecnológicas para esse problema. Os polímeros biodegradáveis, como os poli-hidroxicanoatos (PHAs), vêm ganhando destaque nesse cenário. São acumuladas como reserva de carbono e energia por mais de 250 espécies de bactérias (STEINBÜCHEL, 1991), entre elas *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*.

Atualmente são conhecidos mais de 150 ácidos hidroxialcanoicos que podem compor os PHAs (REHM, 2003; SILVA et al., 2007); as propriedades físico-químicas são regidas pela disposição e pelos diferentes tipos de monômeros que compõem a cadeia polimérica (SIM et al., 1997), variando desde materiais termoplásticos – finos e flexíveis – até materiais duros e quebradiços. Com essas características, eles possuem todos os atributos para substituírem os plásticos de origem petroquímica, porém seu entrave comercial está relacionado ao alto custo de produção. Este chega a ser de 5 a 10 vezes mais oneroso que os polímeros de síntese química (POIRIER; NAWRATH; SOMERVILLE, 1995; GOMES; BUENO NETTO, 1997), o que em parte está relacionado ao substrato utilizado como fonte de carbono, que pode representar 40% do custo de produção (KIM, 2000). Muitos trabalhos têm buscado fontes alternativas de matéria-prima, como a utilização de resíduos agroindustriais.

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e maracujá; a maior parte dessa produção destina-se à industrialização, com geração de grandes volumes de resíduos, que representam em torno de 50% do peso dos frutos. A porção sólida destes resíduos, composta basicamente pela casca e bagaço, pode ser utilizada em diversas finalidades, mas a maior parte acaba disposta de forma inadequada ou aproveitada em aplicações de pouco interesse econômico. Esses materiais são ricas fontes de carboidratos solúveis (glicose, frutose e sacarose) e insolúveis (pectina, celulose e hemicelulose), sendo a pectina o principal constituinte.

Pectinas são hidrocoloides naturais presentes em plantas superiores que formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária das

.....

células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média), contribuindo para a adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009). São compostas majoritariamente por unidades de ácido galacturônico (em torno de 65% do seu peso), ligadas por ligações glicosídicas (α -1-4), formando regiões homogalacturonanas, nas quais seus grupos carboxilas podem estar livres (ou na forma de sal) ou naturalmente esterificados com metanol. As regiões homogalacturonanas são interrompidas por unidades de ramnose, em que estão ligados outros açúcares neutros, incluindo glicose, galactose, xilose, arabinose, entre outros (MAY, 2000).

A pectina é susceptível à degradação por métodos de hidrólise ácida ou enzimática. Métodos ácidos geralmente são empregados em procedimentos analíticos, mas as divergências nos resultados sugerem que as técnicas devem ser significativamente melhoradas (GARNA et al., 2006). Já os métodos enzimáticos são mais empregados na indústria para aumentar o rendimento nos processos de extração de sucos, mas poucos trabalhos têm sido feitos visando à sacarificação da pectina para ser aplicada como substrato em processos de conversão biotecnológica.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os métodos de hidrólise ácida e enzimática de pectina para obtenção de ácido galacturônico e outros monossacarídeos constituintes, e utilizá-los como substrato para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*, visando a encontrar uma fonte alternativa para a produção de PHAs.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PECTINA

Foi utilizada uma pectina cítrica comercial (Vetec®), caracterizada quanto ao grau de esterificação de acordo com a metodologia descrita por Bocek, Zabivalova e Petropavlovskii (2001), em triplicata. Os ensaios de hidrólise ácida foram conduzidos com a pectina na sua forma comercial, enquanto os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos tanto com a pectina comercial quanto com a pectina desesterificada, após a saponificação/desesterificação da amostra.

2.2 HIDRÓLISE ÁCIDA

A reação de hidrólise ácida foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Wenzel (2001). Uma massa de 5 g de pectina foi disposta em um balão de destilação, sendo adicionado um volume de 13,7 mL de água destilada e 36 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a solução ser mantida em repouso durante 1h, foi adicionado um volume de 450 mL de água destilada e a mistura colocada em um rotaevaporador (Marconi®) a 100 °C e mantida em refluxo por 4h. Depois do processo de hidrólise, a amostra permaneceu em repouso por 24 horas, sendo posteriormente filtrada em sistema a vácuo.

.....

O hidrolisado obtido foi analisado quanto ao teor de compostos redutores (CR) pelo método de DNS (MILLER, 1959) e em seguida, concentrado em rotaevaporador a 100 °C. Após ajuste do pH a 7,0 com NaOH 50% (p/v), o hidrolisado foi separado em duas porções: uma porção foi submetida à detoxificação com carvão ativado, conforme descrito por Mussatto e Roberto (2004) e em seguida esterilizada em autoclave; a outra foi apenas esterilizada. Os hidrolisados obtidos foram utilizados para a formulação dos meios de cultura.

Com o objetivo de melhorar as condições de hidrólise e de se obter uma maior concentração de CR, foram feitas algumas modificações no método descrito por Wenzel (2001). Uma massa de 5,0 g de pectina foi disposta em um balão de destilação, sendo adicionado um volume de 500 ml de uma solução de H₂SO₄ (7,2% v/v). O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado, e ao final das 4h de hidrólise, a mistura foi resfriada em banho de gelo, neutralizada a pH 7,0 com NaOH 50% (p/v) e submetida à filtração a vácuo. O hidrolisado obtido foi analisado quanto ao teor de CR e, em seguida, concentrado em rotaevaporador a 100 °C. O hidrolisado concentrado foi esterilizado em autoclave e reservado para a formulação dos meios de cultura para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*.

2.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para os ensaios de hidrólise enzimática foi utilizada uma enzima Endo-poligalacturonase (Endo-PGs) obtida da Sigma® (E.C. 3.2.1.15), com atividade enzimática de 1,32 UI por mg de enzima.

Primeiramente, visando a verificar a atividade da enzima sobre as moléculas de pectina esterificada e não esterificada, foi realizado um ensaio de hidrólise enzimática empregando-se as duas formas da pectina. Pesou-se 1 g de pectina em Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 4,24 mg de enzima (5,6 UI/g), incubando-se a 45 °C, sob agitação de 200 rpm por 24 horas.

Para os ensaios com a pectina saponificada (ou desesterificada), pesou-se 1 g de pectina em Erlenmeyer de 250 mL, umedeceu-se com etanol e adicionou-se 25 mL de NaOH 0,1 N. Após agitação por 2 horas, o pH foi ajustado para 4,8 com HCl 1,0 N e o volume corrigido para 50 mL. Depois desta etapa foram adicionados 50 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,8) e seguido o procedimento já descrito.

Os ensaios foram acompanhados retirando-se amostras iniciais e a cada 15 minutos durante a primeira hora, e em intervalos de 1 hora até 24 horas. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e ambos os tratamentos (pectina desesterificada ou não) foram acompanhados de seus respectivos controles, sem enzima. Ao se retirar cada amostra, a atividade da enzima foi imediatamente interrompida colocando-se a amostra por 5 minutos em água fervente (inclusive para os controles), sendo em seguida armazenadas a 4 °C para as análises de CR.

A atividade enzimática, expressa em unidade de atividade por mililitro (UI/mL), foi calculada pela Equação 1, de acordo com Santos (2007), sendo uma unidade de poligalacturonase a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto.

$$Ativ = \frac{(Abs_a - Abs_b) * f * D}{212,16 * t} \quad (1)$$

Onde: Ativ – Atividade da poligalacturonase (UI/mL); Abs_a – Absorbância da amostra; Abs_b – Absorbância do branco; f – Fator de conversão da curva padrão do ácido galacturônico; D – Diluição da enzima no meio reacional; 212,16 – Peso molecular do ácido galacturônico (g/mol); t – Tempo de hidrólise (min).

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Com base no resultado do ensaio de atividade enzimática, foi realizada a hidrólise enzimática, em triplicata, pesando-se 2,0 g de pectina (sem realizar a saponificação) em Erlenmeyer de 500 mL, adicionando-se 200 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), 8,48 mg de enzima (5,6 UI/g) e seguindo-se o mesmo procedimento descrito no item anterior. O hidrolisado obtido teve seu pH ajustado para 7,0 com NaOH 50% (p/v), sendo posteriormente esterilizado em autoclave e reservado para a formulação dos meios de cultura.

2.5 MICRO-ORGANISMOS

A bactéria *Cupriavidus necator* foi obtida junto ao *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ 545) e mantida na coleção de culturas do Departamento de Antibióticos/UFPE (UFPEDA 0604). *Pseudomonas putida* foi obtida na coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Ambas as culturas foram mantidas em ágar nutriente (AN) e estocadas em geladeira (2 a 6 °C), com repiques periódicos a cada 3-4 semanas.

2.6 MEIOS DE CULTURA

Para a preparação do inóculo foi utilizado o meio Caldo Nutriente (NB), que consiste em 5,0 g de peptona de carne e 3,0 g de extrato de carne para 1 litro de água destilada. Para crescimento celular foi utilizado o Meio Mineral (MM), baseado nos trabalhos de Ramsay et al. (1990), modificado por Aragão et al. (1996). O MM apresenta a seguinte composição, em g/L: Solução 1 (ácido nitrolacético 0,19; citrato ferroso de amônia 0,06; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,5; cloreto de cálcio di-hidratado 0,01; solução de oligoelementos 1,0 mL), Solução 2 (Na₂HPO₄.12H₂O 8,95; KH₂PO₄ 1,5), Solução 3 ((NH₄)₂SO₄ 5,0) e Solução 4 (fonte de carbono). A solução de oligoelementos foi composta, em g/L: H₃BO₃ 3,0; ZnSO₄.7H₂O 1,0; MnCl₂.4H₂O 0,3; NiCl₂.6H₂O 0,2; CuSO₄.5H₂O 0,1. O pH das soluções foi ajustado para 7 com KOH 5 M, sendo autoclavadas separadamente e misturadas de forma asséptica para compor os meios de cultura.

.....

A fonte de carbono variou de acordo com cada ensaio de fermentação, sendo empregado ácido galacturônico 1,5% (p/v), hidrolisado ácido ou hidrolisado enzimático. A concentração final de redutores foi de acordo com o obtido nos ensaios de hidrólise.

2.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A partir de repiques crescidos em meio AN, uma alçada de cada micro-organismo foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo NB. Os Erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora a 300 rpm, 30 °C por 24 horas. Quando os micro-organismos atingiram a fase de crescimento exponencial, as culturas foram transferidas para o meio MM (5% v/v) e incubadas na mesma condição anterior.

Os cultivos foram acompanhados com a retirada de amostras iniciais e em intervalos de 2h, para medidas de pH e densidade óptica a 600 nm, usando um espectrofotômetro Marconi®, fazendo-se diluições com água destilada quando necessário. Os valores de absorbância (Abs) foram convertidos em peso seco celular por meio da curva de calibração, obtida pelo peso seco celular em razão da Abs. Com as amostras iniciais e finais, foram realizadas as análises de CR.

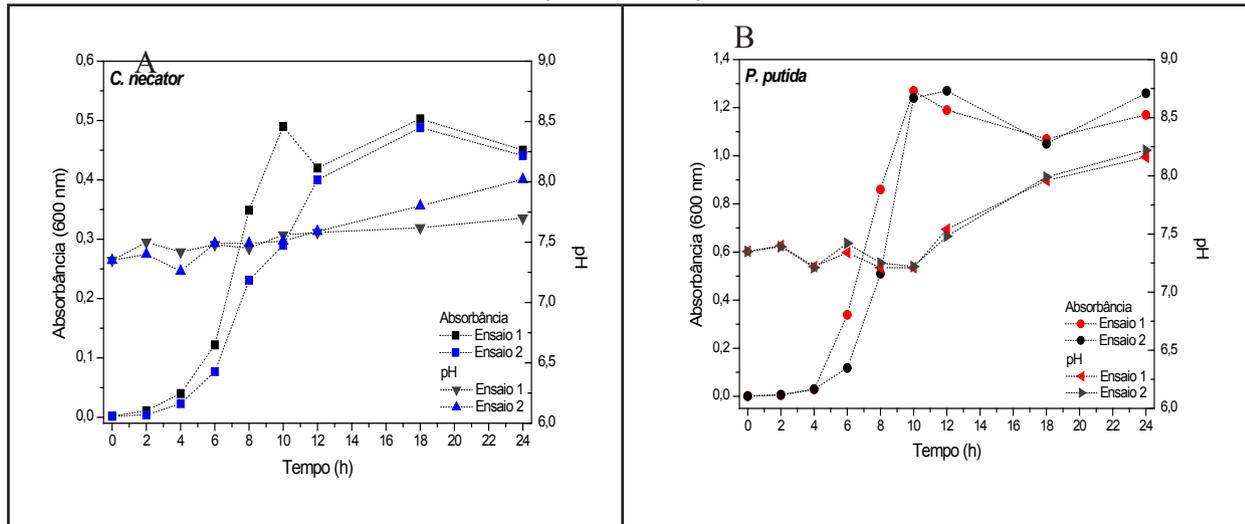
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização da pectina quanto ao seu grau de esterificação apresentou valores de 67,3 ± 1,0%, dessa forma, sendo classificada como pectina com alto grau de esterificação. Segundo May (2000), as pectinas são divididas em duas classes: uma com alto grau de esterificação (>50%), HMP, e outra com baixo grau de esterificação (<50%), LMP. O conhecimento do grau de esterificação da pectina é um dado importante para análise do estudo, pois como demonstrado nos trabalhos de Krall & McFeeters (1998), em condições de pH 3,0 a 100 °C, o aumento do grau de esterificação das pectinas leva a uma redução na taxa de hidrólise, com a liberação mais lenta de CR. De acordo com André-Leroux, Tessier e Bonnin (2009), o grau de substituição também influencia na atividade das Endo-PGs.

3.1 CRESCIMENTO EM CALDO NUTRIENTE – INÓCULO

O Gráfico 1 mostra o crescimento celular e a variação de pH de ambos os micro-organismos em meio caldo nutriente. Ambos os micro-organismos apresentaram uma fase adaptativa (lag) de 4 horas, crescendo exponencialmente até 10 horas de cultivo, com taxas máximas de crescimento (μ_{Max}) de 0,43 e 0,62 h⁻¹, para *C. necator* e *P. putida*, respectivamente. Os valores de pH aumentaram com o crescimento celular para ambas as culturas e com esse monitoramento, estabeleceu-se em 10h o tempo de cultivo do inóculo para transferência para o meio MM.

Gráfico 1 – O crescimento celular e variação de pH durante o cultivo de *C. necator* (A) e *P. putida* (B) em meio caldo nutriente. Os ensaios 1 e 2 representam repetições dos cultivos



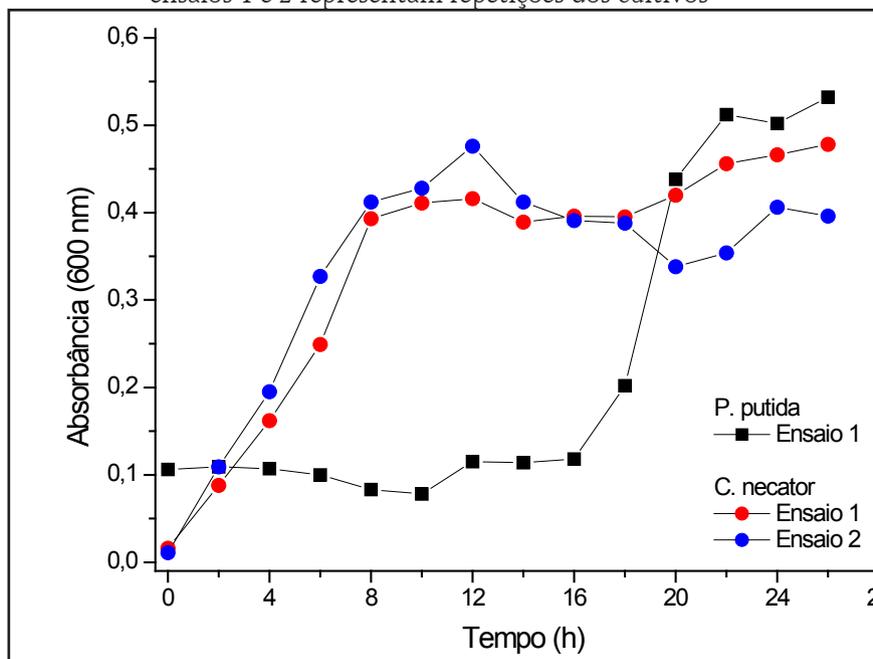
Fonte: os autores.

3.2 CULTIVO EM MEIO MINERAL COM ÁCIDO GALACTURÔNICO

Visando a verificar se o ácido galacturônico era usado como fonte de carbono para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*, foi realizado um ensaio utilizando 1,5% (p/v) de ácido galacturônico como única fonte de carbono. Como podemos observar pelo Gráfico 2, ambas as culturas demonstraram essa capacidade, sendo que *P. putida* apresentou uma fase de adaptação mais lenta, iniciando sua fase exponencial de crescimento após 16 horas de cultivo, em apenas um dos ensaios, enquanto *C. necator* não apresentou nenhuma fase adaptativa, crescendo linearmente até 8 horas de cultivo em ambos os ensaios.

A bactéria *P. putida* é conhecida, como as demais bactérias de seu gênero, pela sua ampla capacidade de assimilar diversos substratos como fonte de carbono. Além da glicose, pode utilizar compostos aromáticos e ácidos alcanoicos (ácido octanoico, ácido undecenoico), produzindo PHAs aromáticos e de cadeia média (TOBIN; O'CONNOR, 2005; HARTMANN et al., 2006; WARD; O'CONNOR, 2005). Da mesma forma, *C. necator* apresenta uma ampla diversidade no uso de substratos como fonte de carbono, mas a única espécie do seu gênero conhecida em assimilar ácido galacturônico para crescimento celular é a *C. taiwanensis* (WEI et al., 2011). Dessa forma, não foram encontrados na literatura relatos do uso de ácido galacturônico por ambos os micro-organismos.

Gráfico 2 – Crescimento celular durante o cultivo de *C. necator* e *P. putida* em meio mineral, contendo ácido galacturônico 1,5% (p/v). Os ensaios 1 e 2 representam repetições dos cultivos



Fonte: os autores.

3.3 HIDRÓLISE ÁCIDA

A Tabela 1 mostra os valores de CR obtidos nos ensaios de hidrólise ácida realizados de acordo com a metodologia de Wenzel (2001). Como podemos observar, o valor de CR no hidrolisado é baixo, aumentando significativamente após a etapa de concentração. Como as condições fortemente ácidas e altas temperaturas favorecem a formação de produtos de degradação das pentoses e hexoses, foi realizada uma etapa de detoxificação com carvão ativo visando à diminuição desses compostos. Entretanto, não foi observado crescimento celular em nenhuma das condições testadas. Os aldeídos furânicos são exemplos de produtos de degradação desses açúcares, sendo relatado na literatura que esses compostos são considerados tóxicos para a maioria dos organismos e bactérias (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGMAR, 1999).

Tabela 1 – Concentrações de CR obtidas nos ensaios de hidrólise ácida e crescimento celular de *C. necator* e *P. putida* com meio mineral formulado com esses hidrolisados

Tratamento	CR* no Hidrolisado (g/L)	CR* no Meio Mineral (g/L)	<i>C. necator</i>	<i>P. putida</i>
Hidrolisado	0,66 ± 0,03	---	---	---
Hidrolisado Concentrado	3,67 ± 0,05	2,55 ± 0,05	Não houve crescimento	Não houve crescimento
Hidrolisado Concentrado e Detoxificado	3,26 ± 0,08	2,25 ± 0,04	Não houve crescimento	Não houve crescimento

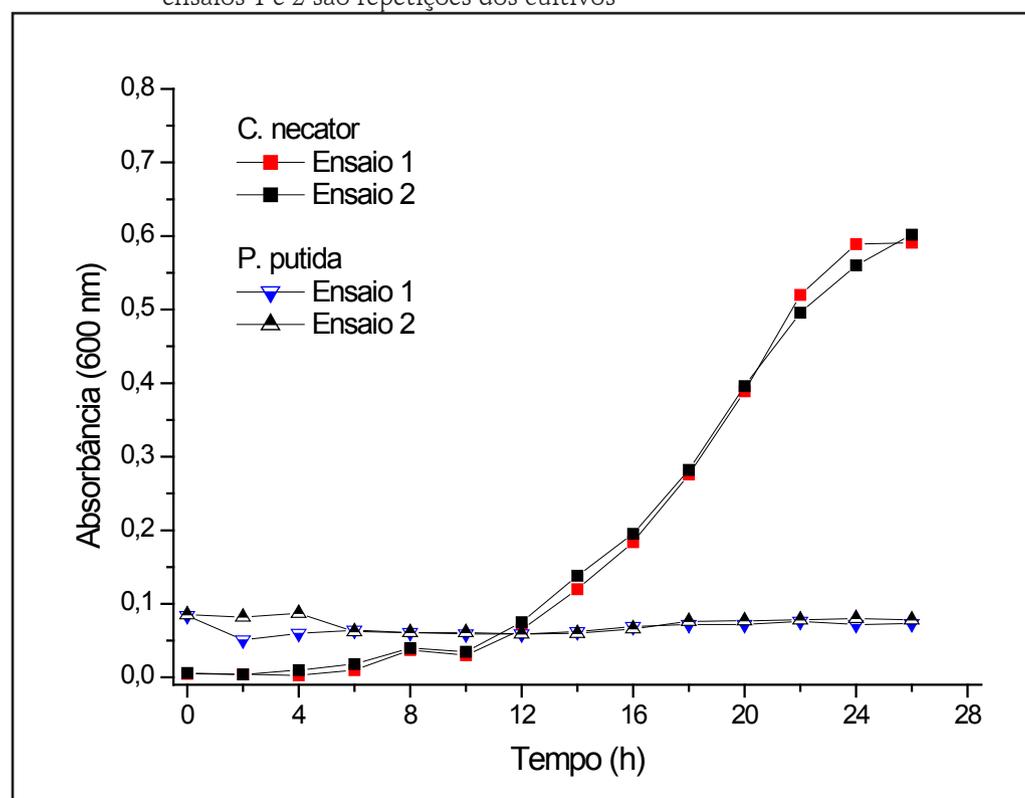
Fonte: os autores.

*Nota: CR: compostos redutores.

Visando a aumentar o rendimento de hidrólise e prevenir a formação de produtos de degradação, foram realizadas algumas adaptações no sistema proposto por Wenzel (2001), eliminando-se a adição de ácido sulfúrico concentrado e as etapas de repouso, com interrupção da reação imediatamente após o tempo de 4h de hidrólise. Dessa forma, foi possível se obter $1,97 \pm 0,06$ g/L de CR diretamente no hidrolisado, e após a etapa de concentração o valor de CR aumentou para $3,15 \pm 0,05$ g/L. O hidrolisado concentrado foi utilizado na formulação do meio mineral, obtendo-se $2,20 \pm 0,08$ g/L, e o resultado do crescimento celular de *C. necator* e *P. putida* pode ser observado no Gráfico 3.

P. putida não apresentou crescimento celular nessas condições de hidrólise, enquanto *C. necator* mostrou uma fase adaptativa de 12 horas, crescendo exponencialmente até 24 horas com μ_{Max} de $0,2$ h⁻¹. Esse resultado é similar ao obtido por Finkler (2002), quando observou uma velocidade máxima de crescimento de $0,21$ h⁻¹ usando açúcar invertido como fonte de carbono. Provavelmente ainda há presença de produtos de degradação no meio e a bactéria *P. putida* se apresentou mais sensível a esses inibidores.

Gráfico 3 – Crescimento celular durante o cultivo de *C. necator* e *P. putida* em meio mineral, formulado com hidrolisado químico de pectina (2,2 g/L de CR). Os ensaios 1 e 2 são repetições dos cultivos



Fonte: os autores.

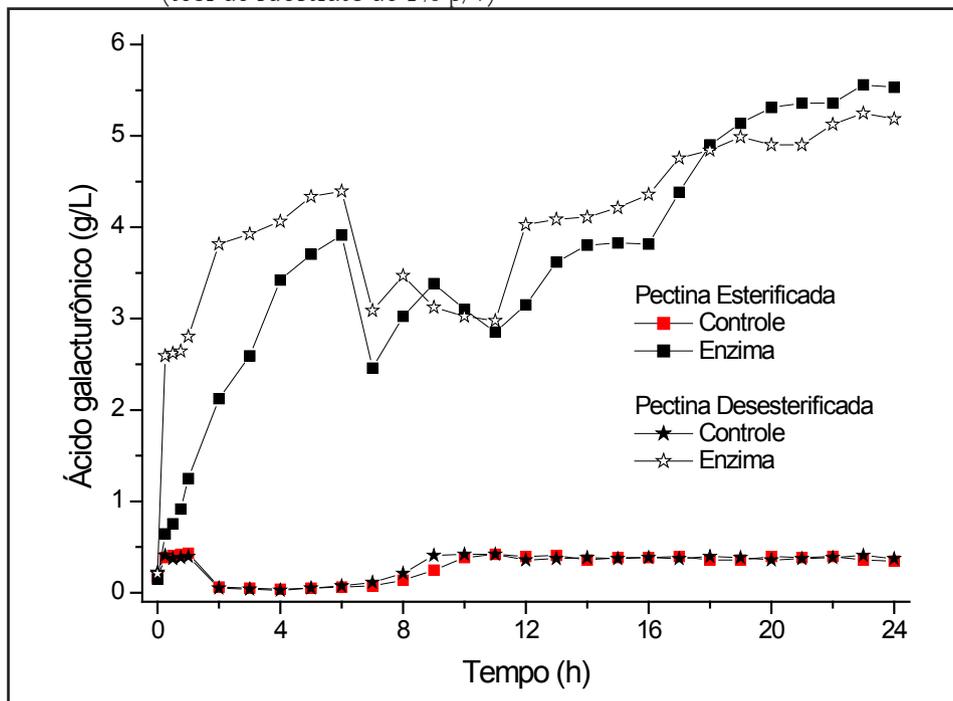
3.4 ATIVIDADE E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os resultados de liberação de ácido galacturônico apresentados no Gráfico 4 mostram que ao final das 24 horas de hidrólise, os ensaios com pectina esterificada e desesterificada apresentaram concentrações de ácido galacturônico de $5,53 \pm 0,05$ g/L e $5,18 \pm 0,05$ g/L, respectivamente. A taxa de liberação de ácido galacturônico aumenta rapidamente nas primeiras 6 horas para ambas as condições, período em que coincide com a diminuição da atividade enzimática, conforme mostra a Gráfico 5.

As endoPGs têm como substrato preferencial as cadeias homogalacturonanas, hidrolisando as ligações glicosídicas α 1→4 entre dois resíduos de ácidos galacturônicos. Estes resíduos podem ser metil-esterificados no grupo carboxílico e acetil-esterificados nos grupos hidroxilas, e com o aumento do grau de substituição, as endoPGs frequentemente diminuem sua atividade (NEUKOM et al., 1963 apud ANDRÉ-LEROUX; TESSIER; BONNIN, 2009).

No entanto, algumas endoPGs têm sua atividade reforçada em substratos ligeiramente metilados. Este é o caso das PG-A e PG-B de *Aspergillus niger*, para as quais foi encontrada uma relação específica de atividade com o grau de metilação (PARENICOVÁ et al., 2000). Já no caso das PG-C e PG-E de *A. niger*, um fraco grau de metilação parece inativar a atividade dessas enzimas (HUANG; MAHONEY, 1999). Como a poligalacturonase utilizada neste trabalho é isolada de *A. niger*, isso pode explicar a variação inicial de atividade entre os ensaios com pectina esterificada e desesterificada.

Gráfico 4 – Conversão de pectina esterificada e desesterificada em ácido galacturônico por tratamento com poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) (teor de substrato de 1% p/v)

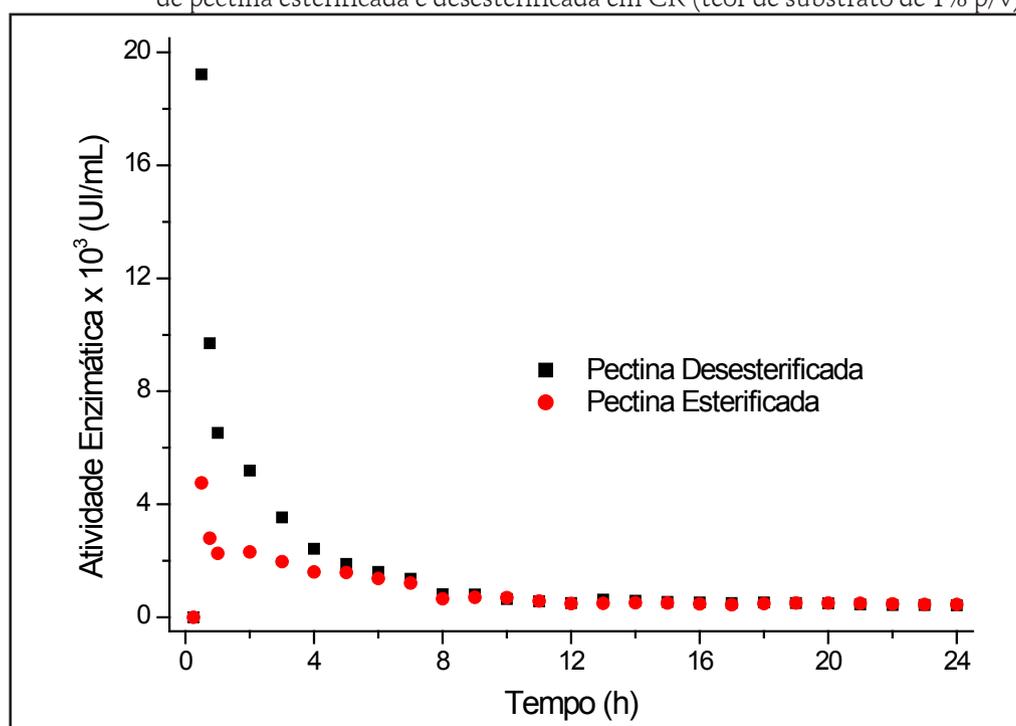


Fonte: os autores.

No ensaio com a pectina desesterificada, agem preferencialmente as PG-C e PG-E, mas também agem as PG-A e PG-B, que não são inativadas por substratos desesterificados. Já no ensaio com pectina esterificada, apenas a PG-A e PG-B têm atividade, que é reforçada pela presença de substratos metilados, sendo a PG-C e PG-E inativadas por estes substratos. Já a diminuição da atividade enzimática, caracterizada de forma mais acentuada após 6 horas de hidrólise, para ambas as condições do ensaio, pode estar associada à diminuição da disponibilidade de substrato para a formação do complexo enzima-substrato (ES), passando a ser o substrato o fator limitante para a atividade enzimática (ROMBOUTS; PILNIK, 1980).

Dessa forma, foi possível verificar que a etapa de saponificação da amostra não é necessária, pois a enzima apresentou rendimentos finais de hidrólise semelhantes em ambas as condições. O procedimento realizado sem a saponificação da amostra (com a pectina na sua forma comercial) foi repetido em triplicata, sendo possível se obter em média $5,62 \pm 0,1$ g/L de CR, esse hidrolisado foi utilizado na formulação do meio MM para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*.

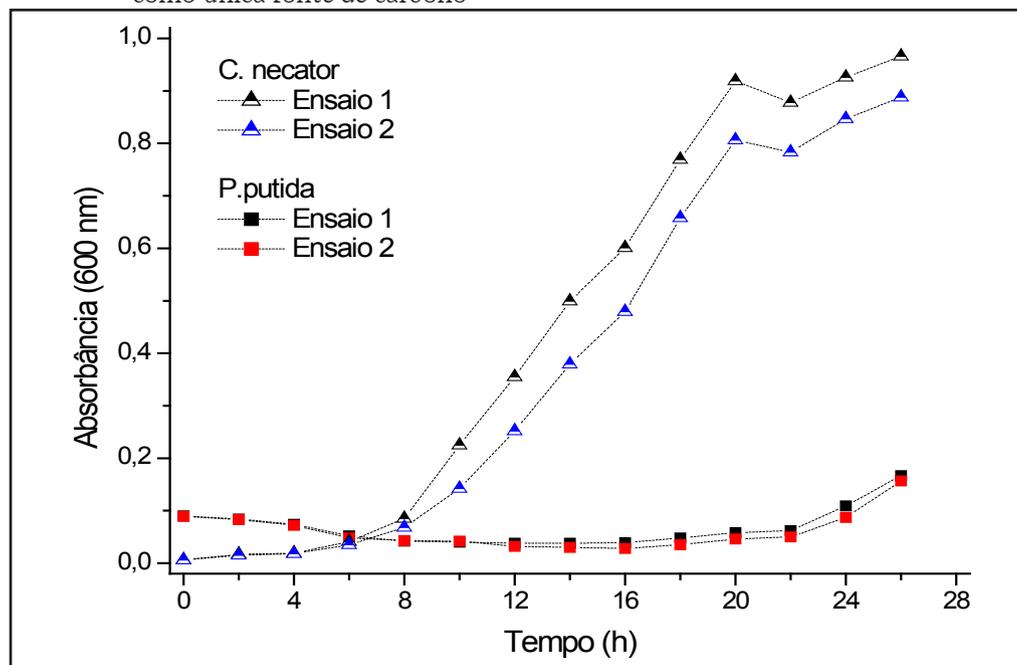
Gráfico 5 – Atividade enzimática da poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) durante a conversão de pectina esterificada e desesterificada em CR (teor de substrato de 1% p/v)



Fonte: os autores.

O Gráfico 6 mostra o acompanhamento do cultivo de ambos os micro-organismos em meio MM formulado com hidrolisado enzimático. *C. necator* foi capaz de crescer utilizando o hidrolisado pectínico como única fonte de carbono, apresentando uma fase de adaptação de 8 horas e μ_{Max} de $0,15$ h⁻¹. Por outro lado, *P. putida* apresentou uma tendência de crescimento apenas após 24 horas de cultivo; dessa forma, o uso desse substrato não foi viável para o crescimento celular desse micro-organismo.

Gráfico 6 – Crescimento celular durante o cultivo de *C. necator* e *P. putida* em meio mineral, contendo hidrolisado enzimático de pectina (4,97g/L de compostos redutores) como única fonte de carbono



Fonte: os autores.

4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática apresentou maiores rendimentos de CR em comparação com a hidrólise ácida, sendo, portanto, mais eficiente como método de obtenção de hidrolisado péctico. A enzima utilizada apresentou atividade tanto sobre a pectina esterificada quanto desesterificada, considerada desnecessária a etapa de saponificação da amostra.

Ambos os micro-organismos foram capazes de crescer em meio MM contendo ácido galacturônico como fonte de carbono, embora *P. putida* tenha apresentado uma maior fase adaptativa. No entanto, com os hidrolisados pécticos obtidos tanto por hidrólise ácida, quanto enzimática, apenas *C. necator* apresentou capacidade de crescimento celular. Além disso, o meio MM formulado com hidrolisado ácido causou uma maior fase adaptativa, sugerindo a presença de inibidores formados pela degradação de pentoses e hexoses devido às fortes condições ácidas utilizadas.

Com base nesses resultados, podemos concluir que a partir da hidrólise enzimática da pectina é possível obter níveis satisfatórios de CR para serem utilizados como fonte de carbono para crescimento celular de *C. necator*, visando à produção de poli-hidroxialcanoatos.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. Endopolygalacturonases reveal molecular features for processivity pattern and tolerance towards acetylated pectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 5-13, 2009.
- ARAGÃO, G. M. F. et al. Maintaining controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *A. eutrophus*. **Biotechnol. Lett.**, v. 18, p. 937-942, 1996.
- BOCHEK, A. M.; ZABIVALOVA, N. M.; PETROPAVLOVSKIIK, G. A. Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. **Russ. J. Appl. Chem.**, v. 74, p. 796-799, 2001.
- FINKLER, L. **Utilização do potencial de óxido-redução para o monitoramento de culturas de *Ralstonia eutropha* visando a produção de polihidroxibutirato**. 2002. Monografia (Especialização em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- GARNA, H. et al. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry**, v. 96, p. 477-484, 2006.
- GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de Plásticos Biodegradáveis por Bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.
- HARTMANN, R. et al. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: batch versus chemostat production. **Biotechnol Bioeng**, v. 93, p. 737-746, 2006.
- HUANG, L. K.; MAHONEY, R. R. Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 145-156, 1999.
- KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- KRALL, S. M.; McFEETERS R. F. Pectin hydrolysis: effect of temperature, degree of methylation, pH and calcium on hydrolysis rates. **Journal Agric Food Chem.**, v. 46, p. 1311-1315, 1998.
- MAY, C. D. Pectins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**, New York: CRC Press, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analyt. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MUSSATTO, S.I. ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, p. 094-100, 2004.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 10, p. 196-211, 2009.

PARENICOVÁ, L. pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Biochem. J.**, v. 345, p. 637-644, 2000.

POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastic and elastomers, in bacteria and plants. **Nature Biotechnology**, v. 13, p. 142-150, 1995.

RAMSAY, B. A. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalyst for plastics. **Journal of Biochemical**, 58 p. set. 2003. Disponível em: <http://www.biochemj.org/bj/imps_x/pdf/BJ20031254.pdf>. Acesso em: 26 set. 2011.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions**, London: Academic Press, p. 227, 1980.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**, Tese 148 f. (Doutorado em Engenharia Química)–Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SILVA, L.F. et al. Revisão - Produção Biotecnológica de Poli-hidroxiálcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SIM, S. J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nat Biotechnol**, v. 15, p. 63-67, 1997.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. (Ed) **Biomaterials: novel materials from biological sources**. Stockton, New York: Stockton, 1991, p. 124-213.

TOBIN, K. M.; O'CONNOR, K. E. Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 111-118, 2005.

WARD, P.G.; O'CONNOR, K.E. Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 127-133, 2005.

WEI, Y. H. et al. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. **Inter J Mol Scien** v. 12, p. 252-265, 2011.

WENZEL, G. E. **Bioquímica experimental dos alimentos**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 2001.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGMAR, L. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng**, v. 65, p. 24-33, 1999.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro às atividades de pesquisa.

