

PURIFICAÇÃO DE PECTINAMETILESTERASE (PME) POR PRECIPITAÇÃO COM ÁLCOOL ISOPROPÍLICO

C. E. V. BUSTAMANTE¹, M. M. S. TRENTINI¹, E. VALDUGA¹, M. DI LUCCIO²

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

² Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Alimentos

E-mail para contato: marciasantin@yahoo.com.br

RESUMO – A utilização de processos de precipitação utilizando álcool isopropílico, preparado em diferentes concentrações (10, 22, 50, 78 e 90%) e bombeado em diferentes vazões (0,09, 2,97, 10, 17 e 19,9 mL/min) ao extrato enzimático (10 mL), foi possível obter fator de purificação (FP) de 7,86 vezes e recuperação (R) de 77,78 % da enzima pectinametilsterase na fase precipitada. A adição de concentrações do álcool acima de 78 % e vazão de 10 mL/min mostrou ser a região maximizada para o FP (~7,86).

1. INTRODUÇÃO

As pectinases são biotecnologicamente importantes porque têm aplicações em potencial no processamento de frutas e legumes, como na clarificação de sucos de frutas, na maceração das fibras naturais, no tratamento de águas residuais pecticas, na fermentação de café e folhas de chá, na extração de óleo, purificação de vírus, etc (YADAV *et al.*, 2008; KHAN, *et al.*, 2013). Estudos sobre estratégias de purificação que utilizem processos simples e de baixo custo, mas que possibilitem alcançar altos fatores de purificação e recuperação da enzima são importantes do ponto de vista industrial. O aumento do grau de pureza das preparações enzimáticas, sem aumentar o custo final da enzima, pode contribuir para incrementar o número de aplicações industriais destas enzimas, melhorando a qualidade final de diversos produtos que podem se beneficiar da tecnologia enzimática. Ainda, preparados enzimáticos mais puros e concentrados implicam em maior rendimento na sua aplicação, pois concentrações menores podem ser utilizadas, desta maneira insere-se o objetivo do trabalho que visa o estudo de processos de precipitação, utilizando álcool isopropílico, na purificação da enzima pectinametilsterase (PME) bioproduzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução de enzima pectinametilsterase (PME)

A cepa do *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi utilizada na bioprodução da enzima segundo metodologia descrita por Gomes *et al.* (2011).

2.2 Purificação por precipitação com álcool isopropílico

Na purificação por precipitação com álcool isopropílico, uma solução de álcool (Quimex) foi preparada em diferentes concentrações (10, 22, 50, 78 e 90 %) e bombeada em diferentes vazões de 0,09, 2,97, 10, 17 e 19,9 mL/min, sendo que as variáveis fixas foram: extrato enzimático (10 mL), temperatura do banho de gelo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), sob agitação lenta, o volume total dos ensaios variou de 11 a 100 mL. Após o bombeamento, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C . Foram preparadas amostras controle onde, no lugar do extrato enzimático, foi utilizada água destilada. As análises foram realizadas nas amostras do precipitado e do sobrenadante, subtraindo o valor da amostra controle, sendo que nos ensaios avaliou-se o fator de purificação (FP), ou seja, relação entre atividade específica da enzima (U/mg) pela atividade específica do extrato bruto inicial (U/mg), e recuperação (R%) da enzima PME, ou seja, relação da atividade total (U/mL) do extrato enzimático da fase e volume da fase (mL) pela atividade total (U/mL) do extrato bruto na alimentação e volume inicial (mL) do extrato bruto adicionado.

2.3 Atividade Enzimática

A atividade da PME foi determinada pelo método de titulação descrita por Hultin *et al.*, 1966.

2.4 Tratamento estatístico

Os resultados de fator de purificação e recuperação das pectinases foram tratados estatisticamente segundo método de planejamento de experimentos, mediante análise dos coeficientes de regressão, dos efeitos estimados (gráfico de Pareto), da análise de variância (ANOVA), seguida de comparação das diferenças das médias pelo teste de Tukey e/ou t-student, em nível de 95 % de confiança, com auxílio do software Statistica versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , com os valores codificados e reais, dos ensaios de precipitação com álcool isopropílico e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da enzima PME na fase precipitada e sobrenadante.

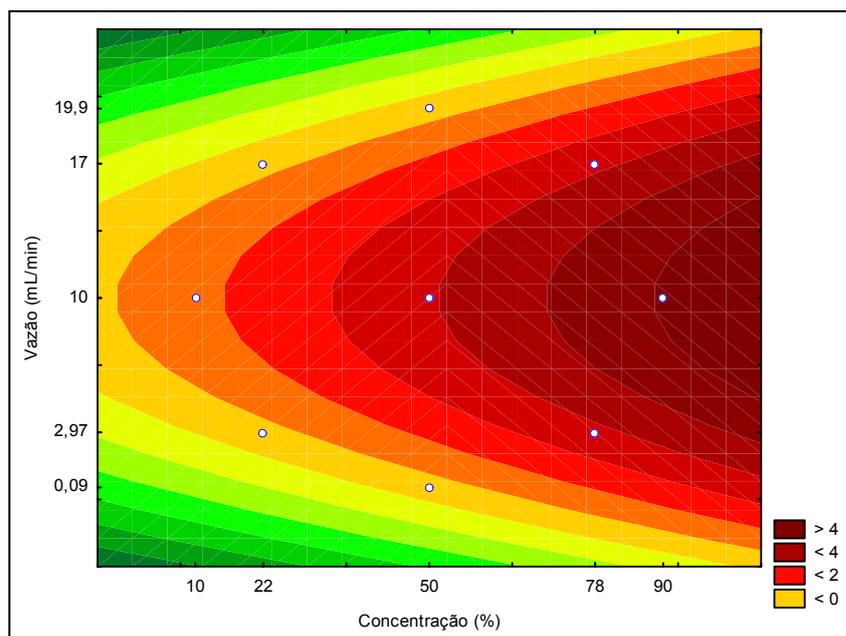
O melhor resultado da enzima foi obtido no ensaio 6 com FP de 7,86 e 1,41 vezes e R de 77,8 % e 50 % na fase precipitada e sobrenadante, respectivamente, utilizando uma concentração de álcool de 90 % e vazão de alimentação de 10 mL/min. A análise de variância validou o modelo codificado de segunda ordem (Equação 1), o qual descreve o FP da enzima PME fase precipitada em função das variáveis testadas, o $F_{\text{calculado}}$ foi 1,67 vezes maior que o F_{tabelado} , com coeficiente de correlação de 0,81. Foi possível construir a curva de contorno para ao FP como mostra a Figura 1, demonstrando que em concentrações do álcool acima de 78 % e vazão de 10 mL/min apresentou-se a região maximizada para o FP ($\sim 7,86$).

As variáveis estudadas para a recuperação (máxima 77,8 %) da enzima PME fase precipitada do planejamento em estudo não apresentaram efeito significativo.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial completo 2², valores codificados (reais) da precipitação com álcool isopropílico fase precipitada e sobrenadante e respostas em fator de purificação e recuperação.

Ensaio	Variáveis Independentes		PME		PME	
			(fase precipitada)		(fase sobrenadante)	
	Concentração (%)	Vazão (mL/min)	FP	R (%)	FP	R (%)
1	-1 (22)	-1 (3)	0	0	0	0
2	+1 (78)	-1 (3)	0	0	0	0
3	-1 (22)	+1 (17)	0,26	22,2	0,24	33,3
4	+1 (78)	+1 (17)	1,49	44,4	0	0
5	-1,41 (10)	0 (10)	0	11,1	0,69	83,3
6	+1,41 (90)	0 (10)	7,86	77,8	1,41	50,0
7	0 (50)	-1,41 (0,1)	0,14	22,2	0	0
8	0 (50)	+1,41 (20)	0,53	33,3	0,46	27,8
9	0 (50)	0 (10)	2,41	55,6	0,57	16,7
10	0 (50)	0 (10)	2,69	44,4	0,49	22,2
11	0 (50)	0 (10)	3,20	33,3	0,33	22,2

Figura 1 - Curva de contorno para o FP da enzima PME fase precipitada álcool isopropílico.

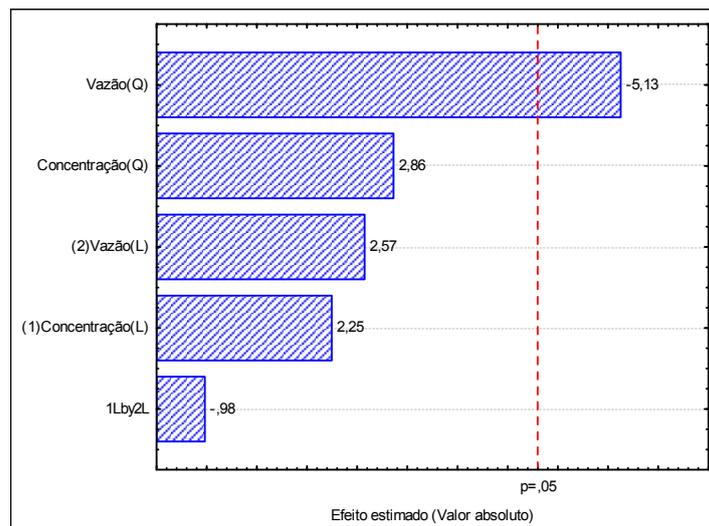


$$FP = 2,77 + 1,54 \times (C) - 1,65 \times (V)^2 \quad (1)$$

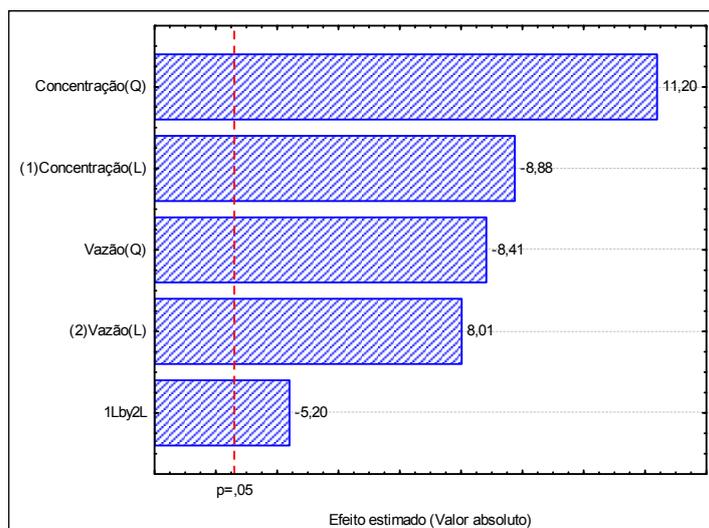
Onde, FP= fator de purificação; C= concentração do álcool; V= vazão da reação.

A Figura 2 (a e b) apresenta os gráficos de Pareto com os efeitos estimados do FP e R da fase sobrenadante da enzima PME, respectivamente. Apenas a vazão quadrática teve efeito significativo ($p < 0,05$) negativo em relação ao FP, com o aumento da vazão ocorre a diminuição do FP. No caso da R da enzima todas as variáveis independentes apresentaram efeito significativo (Figura 2b) sendo os melhores resultados de FP e R obtidos no ensaio 6 (Tabela 1) com valores de 1,41 e 50 %, respectivamente.

Figura 2 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo 2^2 com álcool isopropílico em relação ao FP (a) e a R (b) da enzima PME da fase sobrenadante.



(a)



(b)

A enzima foi detectada na fase precipitada e sobrenadante do ensaio 6, e a atividade específica aumentou nestas fases, mostrando a possibilidade de purificação de PME por precipitação seletiva de proteínas contaminantes com álcool isopropílico. Por outro lado, nos demais ensaios houve baixas recuperações, uma hipótese para este comportamento pode estar relacionadas com a desnaturação da enzima quando exposta ao solvente, conforme já demonstrado por outros estudos (OOI *et al.*, 2009; CORTEZ & PESSOA JR., 1999).

O método de precipitação mostrou ser eficiente na purificação e recuperação da enzima PME, vindo a acrescentar a literatura, já que nenhum trabalho anterior sobre este assunto havia sido encontrado. Segundo Farinas *et al.* (2011) Os autores atribuem a recuperação à massa molar da enzima, justificando que moléculas maiores têm mais chance de agregação do que proteínas menores.

4. CONCLUSÃO

A adição de concentrações do álcool isopropílico acima de 78 % e vazão de 10 mL/min mostrou ser a região maximizada para o fator de purificação o qual obteve fator de purificação de 7,86 vezes. Nesta mesma condição foi possível obter uma recuperação de 77,8 %. Pode-se concluir que o método de precipitação é eficiente na purificação da enzima pectinametilsterase.

5. REFERÊNCIAS

- AYERS, W. A.; PAPAVIDAS, G. C.; DIEM, A. F. Polygalacturonase trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopatol.*, v.56, p.1006-1011, 1966.
- CORTEZ, E. V.; A. PESSOA JR. Xylanase and b-xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 277–283, 1999.

- FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 01, p. 17-26, 2011.
- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, V. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food and Bioproducts Processing*, v. 89, n. 4, p. 281-287, 2011.
- HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties. *J. Food Science*, Chicago, v. 31, n. 3, p. 320-327, 1966.
- KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 4, p. 21-34, 2013.
- OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1083–1087, 2009.
- YADAV, S.; YADAV, P. K. Y.; YADAV, D; YADAV, K. D. S. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry*, 43, p. 547–552, 2008.