

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pré-purificação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger*

Ana Paula Rossetto¹, Márcia Maria Santin Trentini¹, Ivana Correa Ramos Leal²,
Mauricio Moura da Silveira³ e Eunice Valduga^{1*}

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI Erechim)
95070-560 Erechim, RS, Brasil. *E-mail: veunice@uricer.edu.br

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
27933-378, Macaé, RJ, Brasil.

³Universidade de Caxias do Sul (UCS), Instituto de Biotecnologia
95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

RESUMO

*As enzimas pectinolíticas, ou simplesmente pectinases, são empregadas em diversos segmentos industriais, em preparados enzimáticos puros e/ou concentrados. Baseado nestes aspectos, o objetivo do presente estudo foi realizar a pré-purificação das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), pectinametilesterase (PME) e pectina liase (PMGL) produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 utilizando carvão ativado como primeira etapa de um sistema de purificação. Fatores de purificações de 5, 4 e 16 vezes e recuperações de 113, 70 e 213 % foram obtidos para as enzimas exo-PG, PME e PMGL respectivamente. Demonstrando, que a precipitação com carvão ativado foi considerada promissora para a pré-purificação de pectinases, sendo indicado como primeira etapa de um sistema de purificação.*

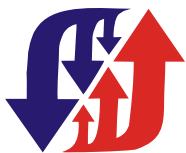
Palavras-chave: enzima, concentração, carvão ativado.

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 pécticas, na fermentação de café e folhas de chá, na extração de óleo, purificação de vírus, etc (YADAV *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2013). Atualmente, a aplicação de enzimas em processos biotecnológicos e industriais é ampla e diversificada, abrangendo diversas áreas. Porém, uma das limitações da indústria de transformação, seja ela de alimentos, química ou farmacêutica, está na recuperação e purificação dos produtos envolvidos.

O aumento do grau de pureza das preparações enzimáticas, sem aumentar o custo final da enzima, pode contribuir para aumentar 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.

A precipitação foi uma das primeiras técnicas utilizadas para separação de enzimas devido à sua simplicidade e vem sendo aplicada há décadas (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005). Desta maneira, insere-se o objetivo deste estudo o qual visa a pré-purificação de pectinases (exo-poligalacturonase - exo-PG, pectinametilesterase - PME e pectina liase PMGL) produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 empregando carvão ativado.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

A cepa do fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 9642 (5×10^6 esporos/g) foi utilizada na bioprodução de enzimas pectinolíticas em cultivo em estado sólido (casca de laranja: 9 g, farelo de trigo: 4 g e água de maceração de milho: 7 g), 30°C, 65 % de umidade relativa e 96 h de cultivo.

O carvão ativado em pó (Alpha, Brasil - LA 810) foi utilizado (1, 5, 10, 20, 40 e 60 g/L) para avaliar a eficiência na remoção de compostos de cor, possíveis sólidos suspensos e proteínas dos extratos enzimáticos brutos. O extrato foi mantido em contato com o carvão por um período de 30 min, 100 rpm e 23°C. Após as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para análise das atividades das pectinases. A exo-PG foi mensurada pela quantificação dos grupos redutores, expressos em ácido galacturônicos (MILLER, 1959). A PMGL foi determinada segundo método de Pitt (1988). A PME foi determinada segundo método descrito por Hultin et al. (1966). As atividades específicas das enzimas foram expressas em termos do teor de proteína, quantificado por Bradford (1976).

O fator de purificação (FP) foi calculado através da Equação 1 (Ooi *et al.*, 2009; Antov e Omorjan, 2009; Mehrnouch *et al.*, 2011):

$$FP = \frac{A_f}{A_i} \quad (1)$$

Onde, A_f = atividade específica da enzima da fase (U/mg); A_i = atividade específica do extrato bruto inicial (U/mg).

A recuperação (R) da enzima foi calculada pela Equação 2 (Ooi *et al.*, 2009; Antov e Omorjan, 2009; Mehrnouch *et al.*, 2011).

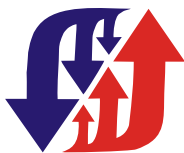
$$R = \frac{A_f \times V_f}{A_i \times V_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde, A_f = atividade total do extrato enzimático da fase (U/mL); A_i = atividade total do extrato bruto na alimentação (U/mL); V_i = volume inicial do extrato bruto adicionado em mL; V_f = volume da fase em mL.

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância, com auxílio do software Statistica versão 8.0, ao nível de significância de 95 % de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados do fator de purificação (FP) e recuperação (R) das enzimas exo-PG, PME e PMGL ao utilizar diferentes concentrações de carvão ativado na etapa de pré-purificação. Os resultados mostram que os melhores resultados para a purificação das pectinases foram obtidos ao utilizar 60 g/L de carvão ativado (Ensaio 6), com fatores de purificação de 5,12, 4,32 e 15,89 vezes para a exo-PG, PME e PMGL, respectivamente. As recuperações variaram de 69 a 113 % para a exo-PG, de 40 a 70 % para a PME e 145 a 213 % para a PMGL.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1. Fator de purificação e recuperação de pectinases empregando carvão ativado

Ensaio	Carvão (g/L)	Exo-PG*		PME*		PMGL*	
		FP	R (%)	FP	R (%)	FP	R (%)
1	1	1,24 ^c	113 ^a	0,62 ^d	56 ^c	1,59 ^d	145 ^d
2	5	1,23 ^c	94 ^c	0,92 ^c	70 ^a	2,38 ^d	182 ^c
3	10	1,56 ^c	103 ^b	1,06 ^c	70 ^a	2,91 ^d	191 ^b
4	20	1,68 ^c	79 ^d	1,37 ^b	64 ^b	4,26 ^c	199 ^b
5	40	2,99 ^b	75 ^d	1,59 ^b	40 ^d	8,31 ^b	209 ^{ab}
6	60	5,12 ^a	69 ^e	4,32 ^a	58 ^c	15,89 ^a	213 ^a

*Médias seguidas de letras iguais/coluna indicam não haver diferença significativa á nível de 5 % (Teste de Tukey).

Na literatura alguns estudos já foram relatados empregando adsorventes na purificação de pectinases. Recentemente Poletto et al. (2015) trataram o extrato enzimática bruto de pectinases (*Aspergillus niger* LB-02-SF) com carvão ativado (5 g/L) e obtiveram uma redução de 72 % de cor, 14 % de proteína e 18 % de purificação de pectinases totais. Dey et al. (2014) observaram um fator de purificação de 38,4 vezes e recuperação de 69,8 % de poligalacturonases após o tratamento 10 g/mL de carvão ativado. Nakkeeran et al. (2010) utilizando 5 g/L de carvão ativado, mostraram que 83 % de cor foram removidos e sem perda significativa de atividade de poligalacturonase.

CONCLUSÕES

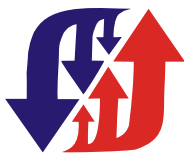
A precipitação com carvão ativado pode ser considerada uma etapa promissora para a concentração e pré-purificação de pectinases, sendo recomendada para uso industrial, com a vantagem de ser um método simples e de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antov M, Omorjan R. 1976. Pectinase partitioning in polyethylene glycol 1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system: statistical modeling of the experimental results. *Bioproc Biosyst Eng* 32:235-240.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch* 72:248-254.
- Dey TB, Adak S, Bhattacharya P, Banerjee R. 2014. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT – Food Sc Technol* 59:591-595.
- Khan M, Nakkeeran E, Umesh-Kumar S. 2013. Potential application of pectinase in developing functional foods. *Annu Rev Food Sci Technol* 4:21-34.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Mehnoush A, Sarker MZI, Mustafa S, Yazid AMM. 2011. Direct Purification of Pectinase from Mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) Peel Using a PEG/Salt-Based Aqueous Two Phase System. *Mol* 16:8419-8427.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426 – 428.

Nakkeeran E, Subramanian R, Umesh-Kumar S. 2010. Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. *J Biosci Bioeng* 109:101-106.

Ooi CW, Tey B T, Hii S L, Kamal SMM, Lan JCW, Ariff A, Ling TC. 2009. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochem* 44: 1083-1087.

Pan IH, Yao HJ, Li YK. 2001. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. *Enzyme Microb Tech* 28:196-201.

Pessoa Jr A., Kilikian BV. 2005. Purificação de produtos biotecnológicos. Manole, São Paulo, 2005.

Pitt D. 1988. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. pinodella. *Methods Enzymol* 161:350-354.

Poletto P, Borsoi C, Zeni M, Silveira MM. 2015. Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juices clarification. *Ciênc Tecnol Aliment* 35: 391-397.

Yadav S, Yadav PKY, Yadav D, Yadav KDS. 2008. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochem* 43:547–552.