

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PECTINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus japonicus*

Larissa C. Olarte^{1*}, Aline P. de Almeida¹, Alex N. Franco², Nelciele C. de A. Guimarães³, Douglas C. Masui⁵, Fabiana F. Zanoelo⁵, Clarice R. Marchetti⁴, Giovana C. Giannesi⁶

1. Mestranda na UFMS pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular
2. Graduando em Ciências Biológicas pela UFMS
3. Doutoranda na UFMS pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular
4. Doutoranda na UFMS pelo programa de Ecologia e Conservação
5. Pesquisador na UFMS – Departamento de Bioquímica e Microrganismos
6. Pesquisador na UFMS – Departamento de Bioquímica e Microrganismos/Orientador

Resumo

As enzimas pectinolíticas ou pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécicas, estas são usadas na extração de sucos de frutas e sua clarificação, tratamento de fibra têxtil e extração de óleo vegetal. O presente trabalho objetivou produzir, purificar parcialmente e caracterizar pectinases secretadas pelo fungo *Aspergillus japonicus*, o qual foi crescido em farelo de trigo como única fonte de carbono, por 24 horas a 30°C sob agitação constante (110 rpm). Colunas de troca iônica (DEAE-celulose) e filtração em gel (Sephacryl S-200) purificaram parcialmente em 6 vezes uma pectinase com recuperação de 40%, a qual foi analisada em gel de eletroforese (SDS-PAGE). A enzima purificada apresentou peso molecular de 34 kDa. A temperatura ideal para a pectinase foi 55°C e em termos de termoestabilidade, após 10 minutos de incubação, a atividade enzimática foi reduzida a 47%, 45% e 17% a 45°C, 50°C e 55°C, respectivamente.

Palavras-chave: enzimas pectinolíticas; *Aspergillus* sp.; termoestabilidade

Introdução

Enzimas pectinolíticas compõem cerca de 25% do mercado mundial de enzimas, tendo assim um amplo espectro de aplicações. Devido à ação que exercem nas paredes das células vegetais, são utilizadas para clarificar sucos de frutas (Mehmet et al., 1999), vinhos (Gump & Halght, 1995) e aumentar os rendimentos nas extrações de sucos e óleos cítricos (Scott, 1978). O uso de microrganismos para a produção dessas enzimas é economicamente viável. Grande parte das pectinases industriais são produzidas por fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* sp., sendo o *Aspergillus niger* um dos mais usados especialmente para a produção industrial de endopectinase (Hadj-Taieb et al., 2002), pois quebra a pectina em pequenas moléculas reduzindo a viscosidade e o tempo de filtração (Jayani et al., 2005). Já *Aspergillus tamarii* apresentou excelente produção de pectinase na combinação de dois resíduos agroindustriais, bagaço de cana e farelo de trigo em pH 6.0 a 55°C (Shanmugavel et al., 2018). Em um estudo com *Aspergillus giganteus*, Ortiz et al. (2017) constataram que esta espécie exibe uma maior atividade pectinolítica em pH 5,8 - 7,0, onde as pectinases utilizadas no processo de extração de azeite melhoraram o rendimento de extração do óleo e das características reológicas sem alterar a composição química.

As enzimas pectinolíticas ácidas de *Aspergillus* sp. possuem um extenso número de aplicações, porém o extrato bruto obtido após o cultivo em meio líquido contém uma mistura de metabólitos, dentre outras enzimas, assim, o processo auxiliar essencial é a purificação da enzima alvo antes da aplicação comercial específica (K Aikat, Maiti & Bhattacharyya, 2001). A seleção do número mínimo de etapas de separação com alta atividade específica e/ou pureza e alta recuperação é recomendada para a aplicação de custo efetivo da enzima purificada.

Metodologia

Aspergillus japonicus, isolado e mantido na Micoteca da UFMS/Campo Grande, foi cultivado em meio líquido contendo 0.4% K₂HPO₄, 0.2% Peptona, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.0001% CaCl₂·2H₂O, 0.0004% FeSO₄·7H₂O, com 1% de farelo de trigo como fonte de carbono sob agitação (110 rpm), por um período de 96 horas a 30°C. Em seguida foi feita a filtração, para extração de enzimas extracelulares.

A atividade da pectinase foi detectada incubando a enzima a 45°C com tampão acetado de sódio pH 5.0 contendo 1% de pectina. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados, e para a avaliação do açúcar redutor liberado foi utilizado DNS conforme o método de Miller (1959), com glicose como açúcar padrão, e então feita a leitura em absorbância a 540nm. A atividade específica foi definida através da relação entre o número de unidades de enzima por miligrama de proteína. A quantificação de proteínas foi realizada segundo o Método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

A purificação parcial de troca iônica foi realizada a 23°C. Um volume de 50 mL da amostra foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM pH 7,5). A amostra de 50 mL foi eluída com o mesmo tampão citado anteriormente e após 20 mL de eluição foi aplicado o gradiente linear de NaCl (1,0 M). Posteriormente foi realizada a cromatografia de exclusão molecular a 4°C. Um volume de 5 mL previamente concentrado da amostra pelo processo de liofilização foi fracionado por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200 equilibrada com tampão Tris HCl (100 mM pH 7).

Frações de 2 mL foram eluídas. O perfil de proteína total foi determinado pela leitura das frações a 280 nm no espectrofotômetro. A atividade de pectinase foi determinada conforme descrito acima. Frações correspondentes à pectinase foram coletadas, dialisadas e liofilizadas. O grau de pureza das amostras foi analisado por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) conforme descrito por Laemmli (1970).

Para determinar a temperatura ótima das atividades pectinolíticas foram realizados ensaios de atividade na faixa de 40 a 65°C. A estabilidade térmica da enzima semipurificada foi avaliada como atividade residual, após sua incubação a 45, 50 e 55°C, na ausência de substrato. Em determinados intervalos de tempo, foram retiradas alíquotas dessas amostras e imediatamente determinadas suas atividades.

Resultados e Discussão

O perfil cromatográfico em resina Sephacryl S-200 mostrou somente um pico de atividade de pectinase (Figura 1).

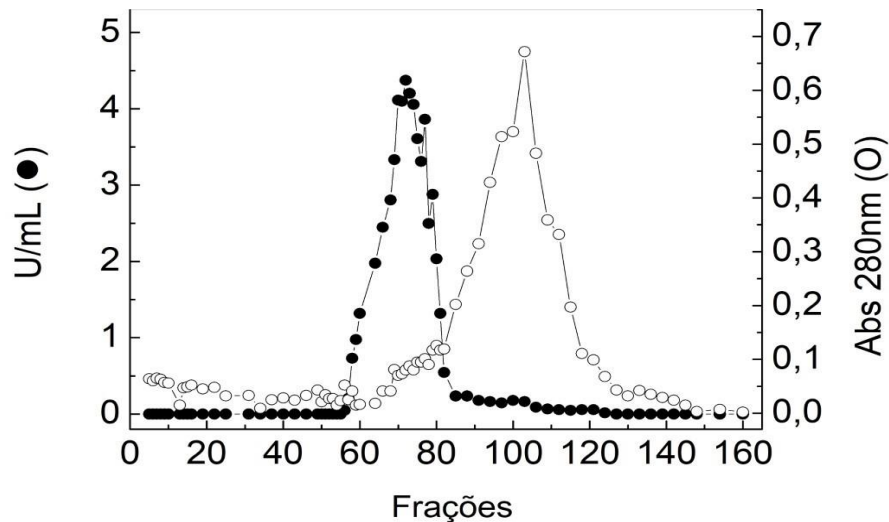


Figura 1. Perfil cromatográfico em Sephacryl S-200 da pectinase de *A. japonicus*. Tampão: Tris-HCl 100 mM pH 7,0.

A atividade enzimática foi eluída a partir da fração 56, com uma atividade de 0,875 U/mL. O pico de atividade ocorreu na fração 72 com atividade de 4,75 U/mL. Todas as frações foram reunidas, dialisadas e liofilizadas para a posterior aplicação em gel SDS-PAGE.

Dados na literatura apresentam diversas maneiras de purificar pectinases. Algumas das metodologias envolvem heterogêneas etapas de cromatografias troca iônica e filtração em gel. (Pedrolli; Carmona, 2010; Ma et al., 2016). Pectinases fúngicas têm sido purificadas com isonomia com diferentes rendimentos de purificação (Gummadi; Panda, 2003; Celestino et al., 2006).

A pectinase de *A. japonicus* foi purificada 6 vezes com recuperação de 40% por cromatografia de filtração (Tabela 1).

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Extrato bruto	67	55,5	1,2	1	100
DEAE – Celulose	72,3	65,8	1,09	0,92	108
Sephacryl S-200	26,85	3,63	7,39	6,17	40

Tabela 1. Purificação da pectinase de *A. japonicus*

O perfil proteico da enzima foi determinado por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE

12%). O gel apresenta uma banda com massa molecular aparente de 34 kDa. A massa molecular notada é concordante com as descritas na literatura de diferentes pectinases isoladas e purificadas de fungos. A pluralidade de massas moleculares de pectinases purificadas varia de 35 até 115 kDa (Khanh et al., 1991; Jacob et al., 2008; Siddiqui et al., 2012; Amin et al., 2017).

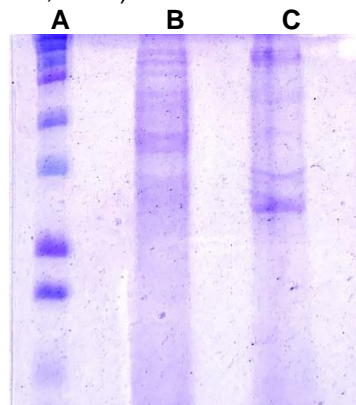


Figura 2. Gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%). **A:** peso molecular. **B:** extrato bruto *A. japonicus*. **C:** pectinase semipurificada.

Com relação à temperatura ideal, foi observado um pico de atividade de pectinase à 55°C (Figura 3).

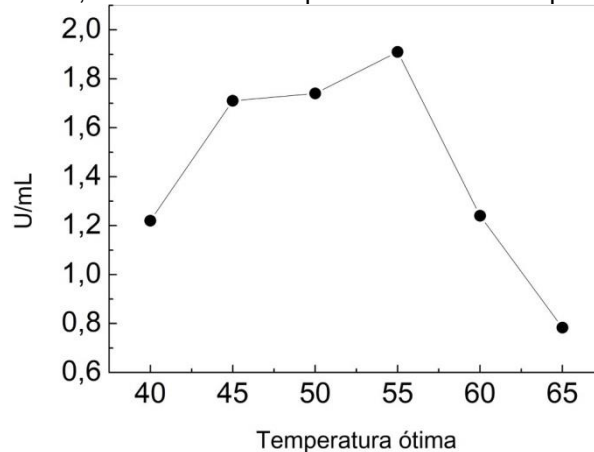


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade pectinolítica

A enzima parcialmente purificada foi submetida a ensaios de termoestabilidade (Figura 4) nos quais foi dosada a atividade residual de pectinase após um período de incubação a 45, 50 e 55°C. Após 10 minutos de incubação, a atividade enzimática foi reduzida a 47%, 45% e 17%, a 45°C, 50°C e 55°C, respectivamente.

Aos 60 minutos de incubação a 55°C, a atividade pectinolítica foi reduzida a 8%. Segundo Semenova et al. (2003) as pectinases de *A. japonicus* apresentaram meias-vidas de 5 minutos a 50°C, já no caso de *A. niger* (Naidu, Panda, 2003), em mesma temperatura, a meia-vida foi de 20 minutos.

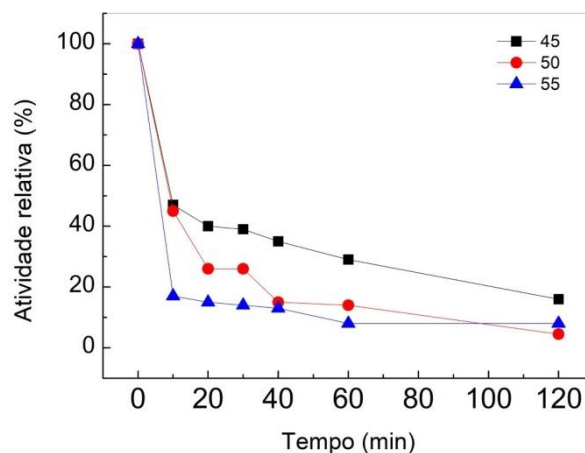


Figura 4. Termoestabilidade da pectinase de *A. japonicus*

Conclusões

A pectinase de *A. japonicus* foi parcialmente purificada até a homogeneidade eletroforética após duas etapas cromatográficas, e a enzima mostrou característica interessante, como atividade máxima a 55°C, apesar de estabilidade abaixo de 50% em sua meia-vida.

Referências bibliográficas

- Aikat, Kaustav, Tapas Kumar Maiti, and Bimal Chandra Bhattacharyya. "Decolorization and purification of crude protease from *Rhizopus oryzae* by activated charcoal and its electrophoretic analysis." *Biotechnology letters* 23.4 (2001): 295-301.
- Amin, Faiza et al. Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium notatum* with industrial perspective. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 183, n. 1, p. 426-443, 2017.
- Celestino, S. M. C.; Maria de Freitas, S.; Javier Medrano, F.; Valle de Sousa, M.; Filho, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *Journal of biotechnology*, v. 123, n. 1, p. 33–42, 2006.
- Gummadi, Sathyanarayana N., and T. Panda. "Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review." *Process biochemistry* 38.7 (2003): 987-996.
- Gump, B.H.; Halght, K.G. A preliminary study of industrial enzyme preparations for colorextration/stability in red wine. California Agricultural Technology Institute - CATI. Publication, Sept. 1995.
- Hadj-Taieb, Noomen, et al. "Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*." *Enzyme and Microbial Technology* 30.5 (2002): 662-666.
- Jacob, N.; Asha Poorna, C.; Prema, P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource technology*, v. 99, n. 14, p. 6697–701, 2008.
- Jayani, Ranveer Singh; Saxena, Shivalika; Gupta, Reena. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.
- Khanh, Nguyen Q., et al. "Characterization and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*." *Gene* 106.1 (1991): 71-77.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227; 680-685, 1970.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-276, 1951.
- Ma, Yuping et al. Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, p. 479-487, 2016.
- Mehmet, M., Kemal, S., Nilay, D., Meral, T. and Ercan, J.A., 1999, The use of commercial Pectinase in fruit juice industry. Part I. viscosimetric determination of enzyme activity. *J Food Eng*, 41: 147–150.
- Miller G.H. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-429, 1959.
- Naidu, G. S. N.; Panda, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 57-67, 2003.
- Ortiz, Gastón E., et al. "Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction." *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 44.2 (2017): 197-211.
- Pedrolli, Danielle Biscaro; Carmona, Eleonora Cano. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 37, n. 6, p. 567-573, 2010.
- Scott D. Enzymes, industrial. In: Grayson M, Ekarth D, Othmer K, editors. *Encyclopedia of chemical technology*. New York: Wiley; 1978. p. 173–224.
- Shanmugavel, Muthiah et al. A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopigments processing. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 15, p. 295-303, 2018.
- Semenova, M. V., et al. "Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*." *Biochemistry (Moscow)* 68.5 (2003): 559-569.
- Siddiqui, M. A.; Pande, V.; ARIF, M. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* Isolated from Decomposing Orange Peels. *Enzyme research*, v. 2012, 2012.