

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Purificação e Caracterização Parcial de Uma Poligalacturonase de *Chrysosporthe cubensis*

Elisa da Silva Barreto¹, Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo² e Valéria Monteze Guimarães²

¹Universidade Federal de Ouro Preto – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas- NUPEB
35430-000 Ouro Preto – MG - E-mail: elisabarreto_88@hotmail.com

²Universidade Federal de Viçosa– Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
35570-900 Viçosa– MG

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram purificar a poligalacturonase (PG) do fungo *Chrysosporthe cubensis* e caracterizar parcialmente a enzima, para identificar propriedades funcionais interessantes para possíveis aplicações biotecnológicas. O fungo foi cultivado em meio semi sólido, contendo farelo de trigo e casca de maracujá na proporção 3:1 e 67% de umidade. Uma poligalacturonase secretada pelo fungo foi purificada 28,34 vezes por cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose, seguida por cromatografia em gel filtração em coluna Sephacryl S200, e exibiu atividade específica de 1117,45U/mg e rendimento final de 29,2 %. A massa molecular da poligalacturonase, obtida por SDS-PAGE foi de, aproximadamente, 40,74 kDa. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 3,5 e 50 °C, respectivamente.

Palavras-chave: Poligalacturonase, *Chrysosporthe cubensis*, purificação

INTRODUÇÃO

As poligalacturonases são pectinases que degradam pectina, um polissacarídeo estrutural complexo, presente na parede celular e lamela média das plantas. Estima-se que as pectinases correspondem a 25% das vendas de enzimas aplicadas na indústria de alimentos (ANURADHA *et al.*, 2014).

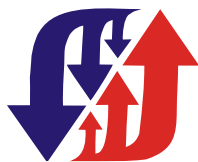
As poligalacturonases, principalmente de fontes microbianas, têm sido utilizadas em vários processos industriais convencionais, incluindo clarificação de sucos; degomagem e maceração de fibras vegetais; fermentação de chá e café; extração de óleos e tratamento de águas residuais industriais (AMID *et al.*, 2014; BUYUKKILECI *et al.*, 2014).

Os produtores microbianos de enzimas pecticas mais conhecidos são espécies de fungos (DEBING *et al.*, 2006). O fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis*, pertence a família Cryphonectriaceae (GRYZENHOUT, *et al.*, 2010). Este fungo, quando cultivado em meio contendo resíduos agroindustriais, tem se destacado na produção de enzimas degradadoras de parede celular, incluindo celulasas, lacases, hemicelulasas e pectinases (VISSER *et al.*, 2013; FALKOSKI *et al.*, 2013; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram purificar e caracterizar, parcialmente, a poligalacturonase secretada pelo *C. cubensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

A produção de enzimas foi realizada a partir de fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e casca de maracujá, na proporção 3:1, como fonte de carbono. Uma cultura de 8 dias do *C. cubensis*, foi inoculada em 12,5g de biomassa e 18,75mL de meio



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

mineral. As enzimas foram extraídas com tampão acetato de sódio, 100mM, pH5, conforme metodologia descrita por Visser *et al.* (2013).

O ensaio enzimático para a poligalacturonase foi o mesmo descrito no trabalho de Visser *et al.*, 2013. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de Miller (1959), usando glicose como padrão. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto, nas condições do ensaio. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), e a curva padrão foi construída utilizando soro albumina bovina.

Para purificar a poligalacturonase, o extrato enzimático bruto foi submetido à cromatografia de troca iônica, em sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), em coluna DEAE-Sepharose, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com gradiente de NaCl 0 - 1 M no mesmo tampão. As frações que apresentaram atividade da poligalacturonase foram reunidas, concentradas por liofilização e diluídas em 5 mL do mesmo tampão. Esta amostra concentrada foi submetida à cromatografia de gel filtração em FPLC com coluna Sephacryl S-200, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0. As frações com atividade de poligalacturonase foram reunidas e submetidas a verificação do grau de pureza e caracterização parcial da enzima.

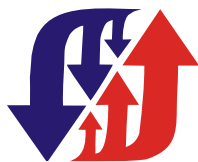
O grau de pureza foi verificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), contendo SDS, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum *et al.* (1987). A massa molecular da enzima foi calculada a partir da curva padrão, produzida com relação a distância percorrida pelo marcador de peso molecular e o logaritmo de sua massa.

A poligalacturonase purificada foi submetida a caracterização parcial, quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade da enzima. Nestes, ensaios enzimáticos foram realizados na faixa de pH de 2,5 a 8,5 e temperatura na faixa de 25°C a 70°C para avaliar o efeito do pH e temperatura na atividade da enzima, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A poligalacturonase produzida pelo *C. cubensis*, foi purificada por uma combinação dos métodos cromatográficos troca iônica e gel filtração. O perfil cromatográfico resultante da troca iônica, em coluna DEAE-Sepharose, mostrou um elevado pico protéico com atividade da poligalacturonase, que foi eluído antes da aplicação do gradiente salino (FIGURA 1A). Das 130,1 U de PG carregadas na coluna, 104,62 U foram recuperadas, com rendimento de 80,41 %. Nesta etapa, a enzima foi purificada 3,13 vezes e exibiu atividade específica de 123,52 U/mg de proteína (TABELA 1). O perfil cromatográfico da troca iônica também mostrou que o maior pico protéico, porém sem atividade de poligalacturonase, foi eluído durante o gradiente salino (FIGURA 1A). Assim, pode se afirmar que a maior parte das proteínas contaminantes foi eliminada da fração PG ativa, sendo que, dos 3,3 mg de proteínas presentes no extrato bruto, apenas 0,847 mg foram recuperadas antes do gradiente salino. Entretanto, o fato do primeiro pico protéico coincidir com o pico ativo, evidencia a possibilidade da presença de proteínas contaminantes terem sido eluídas juntamente com a enzima alvo.

O perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular mostrou um pico protéico principal, com atividade de poligalacturonase, que foi eluído nas frações de 48 a 52. Nesta



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

etapa, a atividade específica aumentou consideravelmente, passando de 123,52 U/mg para 1117,45 U/mg, com rendimento de 29,2 % (TABELA 1 e FIGURA 1B).

Desta forma, a partir dos procedimentos aplicados neste trabalho, a poligalacturonase de *C. cubensis* foi purificada 28,34 vezes, indicando que a metodologia utilizada garantiu uma purificação eficiente, quando comparada a trabalhos anteriores descritos na literatura.

A análise do gel SDS-PAGE 12 %, (Figura 1C e 1D) mostrou que a cada etapa de purificação, proteínas contaminantes foram eliminadas, e por isso o número de bandas proteicas visualizadas no gel diminuiu. Adicionalmente, a visualização de uma única banda de proteína após a última etapa cromatográfica comprova a homogeneidade da enzima e eficiência da combinação dos métodos cromatográficos utilizados neste trabalho (FIGURA 1C e 1D). A determinação da massa molecular da poligalacturonase do *C. cubensis* em gel SDS-PAGE indicou que esta proteína é de , aproximadamente 40,74 kDa.

A atividade máxima da enzima foi observada em pH 3,5 e cerca de 60 % desta atividade foi detectada na faixa de pH de 4 a 5. Todavia, acima destes valores de pH, houve drástica redução na atividade da enzima, com total inativação em pH acima de 5,5 (FIGURA 2A).

As análises do efeito da temperatura na atividade da enzima mostraram que a atividade da poligalacturonase aumentou a partir de 25 °C, e alcançou máxima atividade a 50 °C. Entretanto, a 55 °C a enzima manteve cerca de 88 % da sua atividade, apenas 22% a 60 °C, e houve completa inativação a 70 °C (FIGURA 2B).

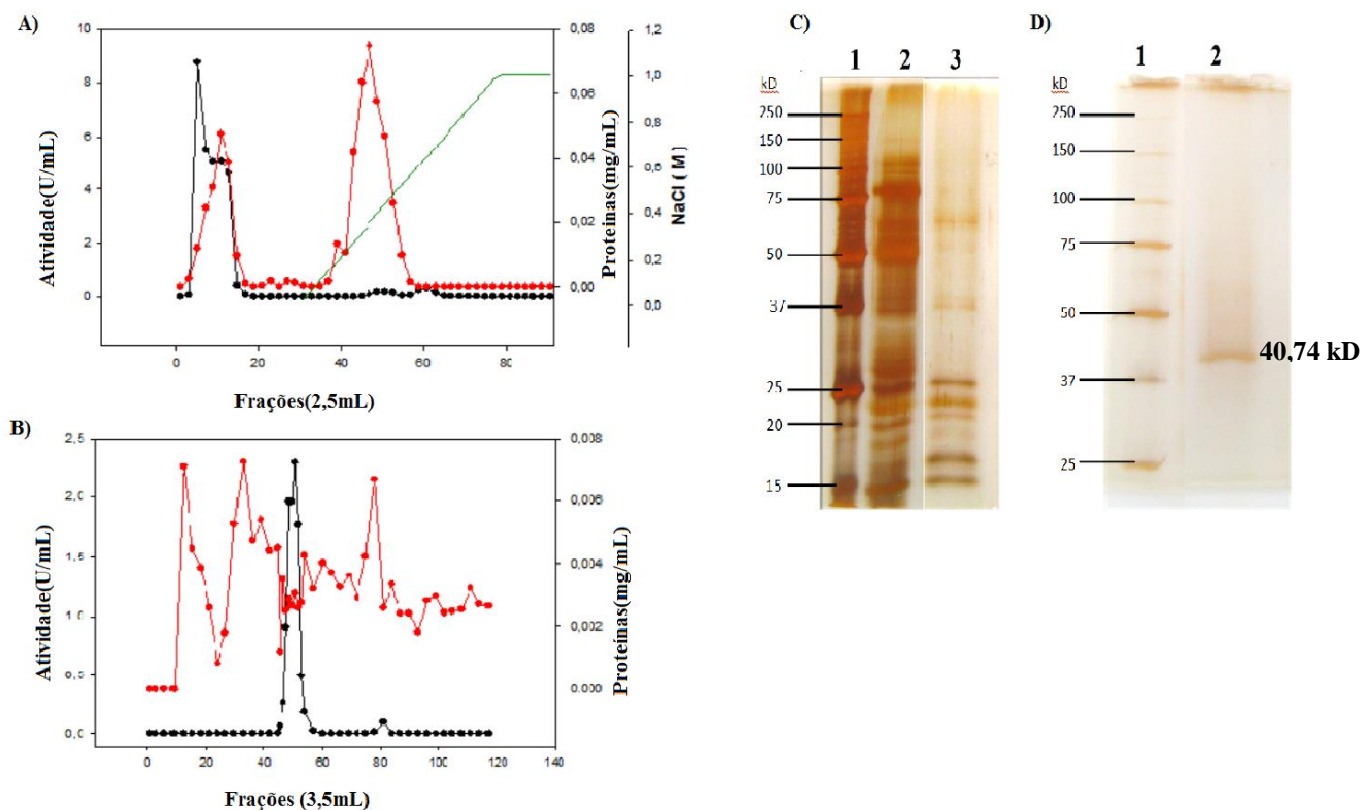
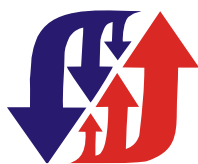


Figura 1: Perfis cromatográficos obtidos após as etapas de purificação e SDS- PAGE 12% . **A)** Coluna DEAE-Sephrose. **B)** Coluna Sephacryl S-200. Atividade poligalacturonase (●); Proteínas (●); Gradiente salino (—). **C)** 1- Marcador de massa molecular; 2- Extrato Bruto; 3- Frações ativas provenientes da cromatografia de troca iônica; **D)** 1- Marcador de peso molecular ; 2- Frações ativas provenientes da gel filtração.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1: Resumo das etapas de purificação

Etapa de Purificação	Proteínas Totais (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação (x)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	3,3	130,1	39,42	1	100
Troca Iônica (DEAE-Sepharose)	0,847	104,62	123,52	3,13	80,41
Gel Filtração (Sephacryl S-200)	0,034	37,99	1117,45	28,34	29,2

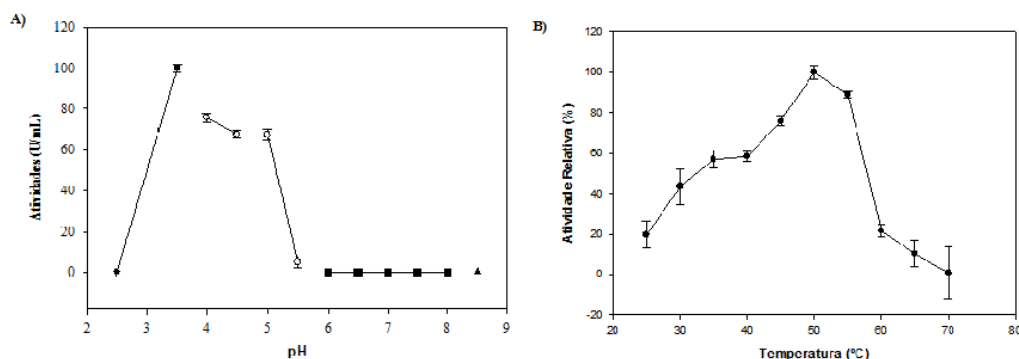


Figura 2: A) Efeito do pH na atividade da poligalacturonase de *C. cubensis*. B) efeito da temperatura na atividade da poligalacturonase de *C. cubensis*.

CONCLUSÕES

A poligalacturonase foi purificada, eficientemente, pela combinação dos métodos de cromatografia de troca iônica e gel filtração. A enzima foi purificada 28,34 vezes, com atividade específica foi de 1117,45 U.mg⁻¹. A análise de eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE 12%), evidenciou massa molecular de 40,74 kDa. A enzima apresentou características desejáveis para aplicação na indústria de sucos, como caráter ácido, com pH ótimo igual a 3,5 e temperatura ótima de 50°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amid, M. *et al.* 2014 Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *Eur Food Res Technol*, 239: 21–29.
- Anuradha, K *et al.* 2014 Selection of nutrients for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* MTCC 9166 using Plackett-Burman design. *J. Food Process Technol*, 13: 502–507.
- Blum, H.*et al.* 1987.Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 8:93–99.
- Buyukkileci, A. O., *et al.* 2014. Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 749–760.
- Debing, J. *et al.* 2006.Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 244–250.
- Falkoski, D. L. *et al.* 2013. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bio Tech*, 130: 296–305.
- Gryzenhout, M *et al.* 2010. *Cryptometrion aestuescens* gen. sp. nov. (Cryptonectriaceae) pathogenic to *Eucalyptus* in Indonesia. *Australasian Plant Pathology*, 39: 161–169.
- Kusuma, M.P., *et al.* 2014.Purification and characterization of polygalacturonase using isolated *Bacillus subtilis* C4. *Research J.of Microbiology*, 9: 95–103.
- Maitan-Alfenas, G. P. *et al.* 2015. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. *Bioresource technology*, 192: 670–6.
- Miller, L. G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31: 426–428.
- Udenwobele, D.I. *et al.* 2014. Extraction, partial purification and characterization of pectinases isolated from *Aspergillus* species cultured on mango (*Mangifera indica*) peels. *Afr. J. of Biotechnol.*, 13: 2445–2454.
- Visser, E.M. *et al.* 2013. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bio Tech*, 144:587–594.

APOIO: CAPES, FAPEMIG, CNP e UFV