



EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE PRECIPITAÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DO ABACAXIZEIRO

Costa, H. B.¹, Fernandes, P.M.B.¹, Ventura, J.A.^{1,2}.

¹Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES; biotecnologia.ufes@gmail.com; ²Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, Vitória-ES; ventura@incaper.es.gov.br.

INTRODUÇÃO

O abacaxi é uma planta monocotiledônea da família das Bromeliaceae, pertencente à espécie *Ananas comosus* var *comosus*, que compreende muitas variedades hortícolas, incluindo novas variedades desenvolvidas resistentes à fusariose (VENTURA et. al, 2008) sendo o fruto-símbolo das regiões tropicais e subtropicais, de grande aceitação em todo o mundo, quer *in natura*, quer industrializado.

Os tecidos do abacaxi são ricos em um grupo de enzimas proteolíticas, conhecido com o nome geral de bromelinas. As enzimas proteolíticas ou proteases são amplamente empregadas em diferentes tipos de indústria e apresentam grande interesse biotecnológico. A bromelina é assim um subproduto do abacaxizeiro de alto valor comercial, utilizado na indústria alimentícia, têxtil, cervejeira e farmacêutica, além da importante aplicabilidade na medicina. Para essas aplicações, é necessário a utilização de extratos puros e semi-puros desta proteína.

O interesse em novos processos biotecnológicos vem crescendo substancialmente nas últimas décadas. O amplo uso da bromelina tem aumentado a importância de se estudar processos viáveis de extração e purificação deste grupo de enzimas. Além disso, a purificação em novos genótipos resistentes à fusariose, pode indicar oportunidades que minimizam as perdas e agregam valores ao agronegócio do abacaxi.

O objetivo deste trabalho foi escolher a melhor forma de extração de bromelina do abacaxi, considerando a atividade proteolítica, e a purificação parcial de bromelina por comparação de duas técnicas de precipitação fracionada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os extratos protéicos foram obtidos em cinco diferentes tampões de extração (Tampão ácido sulfúrico/sulfato de sódio pH 4,5; tampão acetato pH 3,6; tampão acetato pH 4,0; tampão acetato pH 5,0 e tampão fosfato pH 7,0). Foi determinado o teor de proteínas totais pelo método de BRADFORD (1976), a atividade proteolítica pelo método de Depeau (1976) modificado e foi feito uma relação entre os dois valores para se obter a atividade específica das enzimas proteolíticas. O tampão de extração que levou a uma maior atividade proteolítica foi escolhido para o processo de comparação de duas técnicas de precipitação. Foram realizadas duas técnicas de precipitação, usando (1) sulfato de amônio e (2) acetona gelada. Os extratos protéicos foram divididos em três diferentes frações (0-20% ; 20–50% e 50-75%). As frações de sulfato de amônio foram submetidas à diálise em membrana de 3,5 KDa contra o tampão de extração em diferentes concentrações, durante 48 horas. Após essa diálise, as frações foram submetidas à determinação do teor de proteínas totais, atividade proteolítica e SDS-PAGE 12%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tampões ácido sulfúrico/sulfato de sódio pH 4,5 e acetato pH 4, dos cinco tampões utilizados, foram os melhores para a extração de proteínas, uma vez que os extratos obtidos apresentaram maiores valores de proteínas totais (1,17 mg/ml e 1,13 mg/ml, respectivamente). Além disso, os extratos protéicos obtidos utilizando ácido sulfúrico/sulfato de sódio e fosfato pH 7 apresentaram valores maiores de atividade proteolítica, 37,54 U/ml e 17,19 U/ml respectivamente. Os valores de atividade específica das enzimas proteolíticas foram maiores nos extratos obtidos com tampões acetato pH 5 (28,81 U/mg) e ácido sulfúrico/sulfato de sódio (32,08 U/mg) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de proteínas totais, atividades proteolíticas e específicas dos extratos protéicos obtidos em diferentes tampões de extração.

Tampões de extração	Proteínas totais (mg/ml)	Atividade Proteolítica (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Tampão Ácido Sulfúrico/Sulfato de Sódio pH 4,5	1,17	37,54	32,08
Tampão Acetato pH 3,6	0,458	9,71	21,20
Tampão Acetato pH 4,0	1,13	15,56	13,76
Tampão Acetato pH 5,0	0,48	13,83	28,81
Tampão fosfato pH 7,0	0,878	17,19	19,57

O extrato obtido com o tampão ácido sulfúrico/sulfato de sódio pH 4,5 foi, então, escolhido para a continuidade do trabalho, uma vez que apresentou maior rendimento de extração de proteínas totais, além de maior atividade proteolítica. Mais ainda, o extrato obtido através deste tampão também resultou em proteínas com o maior valor de atividade específica para enzimas proteolíticas.

Na comparação das duas técnicas de precipitação fracionada, a precipitação por sulfato de amônio foi mais efetiva na manutenção dos valores de atividade proteolítica nas frações 20–50% e 50-75%, quando comparadas à precipitação por acetona gelada. Além disso, utilizando uma razão entre as atividades das frações e a atividade do extrato protéico, pôde ser observado que essas frações apresentaram atividade proteolítica mais próxima do extrato protéico total (88,57% e 98,42% respectivamente). Os resultados indicam que a precipitação por sulfato de amônio é a técnica mais efetiva para os passos iniciais de purificação de bromelina (Tabela 2).

TABELA 2 - Valores obtidos na comparação da precipitação fracionada com sulfato de amônio e acetona gelada.

Tampões de extração	Proteínas totais (mg/ml)	Atividade Proteolítica (U/ml)	Recuperação (%)	Atividade Específica (U/mg)
Extrato Protéico	1,17	37,54	100	32,93
0 - 20% - Sulfato	0,41	8,13	21,65	19,82
20 – 50% - Sulfato	0,921	33,25	88,57	36,10
50 – 75% - Sulfato	0,785	36,95	98,42	47,07
0 – 20% - Acetona gelada	0,498	31,12	82,89	62,48
20 - 50% - Acetona gelada	0,541	21,70	57,80	40,11
50 -75% - Acetona gelada	1,048	16,58	44,16	15,82

A análise do perfil protéico por SDS-PAGE demonstrou que todas as frações apresentaram bandas de mesmo peso molecular que o padrão de bromelina (figura 1 – 2). No entanto, merecem destaque as frações 20–50% e 50-75% de sulfato (Figura 1 – 4 e 5), uma vez que, além de possuírem bandas com o mesmo peso molecular, apresentaram maiores valores de atividade proteolítica, como discutido anteriormente; podendo ser um indicativo provável de maior concentração desta enzima nessas frações. Dessa forma, levando-se em conta o grau de pureza das enzimas proteolíticas necessário, a utilização dessas frações para uso ou para posterior purificação da bromelina deve ser averiguada, de acordo com o objetivo para o qual se pretende utilizá-la.

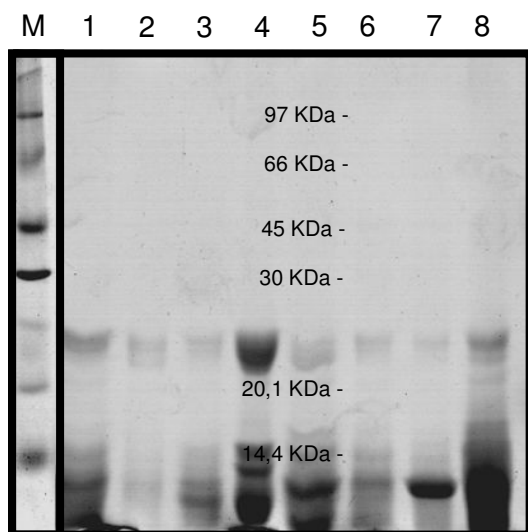


FIGURA 1 - SDS-PAGE das frações obtidas nas precipitações com sulfato de amônio e acetona gelada (M – Marcador de peso molecular; 1 – Extrato Protéico; 2 – Padrão de Bromelina; 3 – Sulfato 0 – 20%; 4 – Sulfato 20 – 50%; 5 – Sulfato 50 – 75% ; 6 – Acetona 0 - 20 %; 7 – Acetona 20 – 50 %; 8 – Acetona 50 – 75%).

CONCLUSÕES

Os caules de abacaxizeiro podem ser considerados uma boa fonte de matéria prima para recuperação de enzimas proteolíticas. Na comparação entre as técnicas de extração e de precipitação, a extração com tampão ácido sulfúrico/sulfato de sódio pH 4,5 seguida de precipitação por sulfato de amônio, demonstrou ser mais efetiva no processo inicial de purificação da bromelina do abacaxizeiro.

REFERÊNCIAS

- COSTA, H.B.; FORTUNATO F.S; DELBONI, S.G.; VENTURA, J.A. Proteolytic activity in stems of 'Vitória', 'Smooth Cayenne' and 'Pérola' pineapple plants. **Pineapple News**. Honolulu, v. 15, p.70, 2008.
- DEPEAU, G. R. **Methods in Enzimology**. v. 45 New York: Academic Press, 1976.
- GARCIA-CARRENO, F. L.; DEL TORO, M. N. Classification of Proteases Without Tears. **Biochemical Education**. Leeds, v. 25, n. 3, p.161-167, 1997



XX Congresso Brasileiro de Fruticultura
54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture
12 a 17 de Outubro de 2008 - Centro de Convenções – Vitória/ES

MICHAIL, M.; VASILIADOU, M.; ZOTOS, A. Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads. **Food Chemistry**. Grécia, v.97, n.1, 2006.

VENTURA, J. A. ; CABRAL, J. R. S. ; MATOS, A. P. ; COSTA, H. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose **Pineapple News**. Honolulu, v. 15, p. 53, 2008.

20080726_101835