

POLÍMEROS NÃO-IÔNICOS COMO AGENTES PRECIPITANTES EM PROCESSOS DE CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

**Marcelo J. Anghinoni Nava, Mauricio Moura da Silveira , Sinara Fachinelli dos Santos e
Mara Zeni**

Instituto de Biotecnologia e Departamento de Física e Química, UNIVERSIDADE DE
CAXIAS DO SUL-BRAZIL. Correo electrónico: mzandrad@ucs.br)

RESUMO

Avaliou-se o emprego de Poli(vinil álcool) (PVA) e Poli(etileno glicol) (PEG) como agentes precipitantes não-iônicos nos processos de concentração de enzimas pectinolíticas. Essas enzimas são polissacarídeos hidro-solúveis presentes na lamela média de células primárias de vegetais superiores e são obtidas a partir da fermentação do farelo de trigo com o fungo *Aspergillus orizae*. PVA e PEG apresentam estrutura helicoidal, são solúveis em água e baixa densidade relativa. Diferentes pesos moleculares foram testados, para soluções aquosas de PVA e PEG nas concentrações entre 2 e 15% (p/v), dissolvidas em água a 80°C e sob uma faixa de temperatura entre 0 e 20°C. O polímero, adicionado ao caldo enzimático foi centrifugado duas vezes, produzindo um precipitado protéico. A separação deste precipitado de seu sobrenadante, seguiu o método analítico propostos por Bradford (conteúdo protéico) e Somogyi (atividade enzimática). Resultados demonstram uma íntima dependência de temperatura, pH, concentração polimérica e peso molecular na concentração e atividade enzimática. PVA 80.000 g/mol é um eficiente agente precipitante de pectinases, mas o PVA 20.000 g/mol e PEG 400 são eficientes relacionado à atividade enzimática. Apesar do PVA ter apresentado melhores resultados nos parâmetros individuais, PEG demonstrou maior equilíbrio entre eles.

Palavras-chave: polímeros não-iônicos; poli(vinil álcool); poli(etileno glicol); concentração enzimática; enzimas pectinolíticas.

ABSTRACT

Assesmented the job of PVA and PEG as precipitante agents of enzymes pectinases. This enzymes are polysacaride hydro-soluble gifts in lamella medium of the primary uper vegetable cells – gotten from the fermentation of the bran of wheat for the *Aspergillus orizae*. The poly(vinyl alcohol) and the poly(ethilen glycol) are a not ionics polymers, of low relative density and has helical structure. Differents molar masses was tested with water-solutions in concentrations between 2 and 15 % (w/v), dissolved in the water at 80°C and temperatura range 0 to 20 °C. The polymer, added to the daily pay-filtered was centrifugaded two times, producing one proteic precipitate. The separation of this precipitated and the supernatant and submitted to the methods of analysis is made considered by Bradford (proteic content) and Somogyi (enzymatic activity). Result show a whole dependence of temperature, pH, polymer concentration and molecular weight under enzymatic's activity and proteic content. The PVA 80,000 g/mol is the efficient precipitante agent from pectinases but the PVA 20,000 is efficient concerning enzymatic ativity. Despite PVA has shown better results on individual parameters, PEG has shown more equilibrium among it.

Keywords: non ionic polymers; poly(vinyl alcohol); poly(ethylenglycol); enzymatic concentration; pectinolytic enzymn

INTRODUÇÃO

O poli(vinil álcool) (PVA) e o Poli(etilenoglicol) (PEG) são polímeros não-iônicos, solúveis em água; o PVA tem sido muito estudado em sistemas coloidais, sendo biodegradável com bactérias *Pseudomonas* (1), enquanto que o PEG tem sido utilizado como agente precipitante de proteínas do plasma, por exemplo fibrinogênio, pela sua possibilidade de variações de peso molecular, neutralidade e solubilidade em água (2).

As pectinas são polissacarídeos hidro-solúveis presentes na lamela central das células primárias de vegetais superiores. Suas propriedades físico-químicas, na forma natural ou após extração, são de grande importância funcional e nutricional para o homem. Daí, surge a importância da criação de um método para se obter boas concentrações dessas enzimas (3).

Neste trabalho foi estudado o PVA e o PEG como agente precipitante das pectinases obtidas da fermentação de farelo de trigo, sob diferentes temperaturas, concentrações aquosas e pesos moleculares.

EXPERIMENTAL

Foram preparadas soluções de PVA (pesos moleculares de 20.000, 45.000, 80.000 e 72.000 g/mol) e de PEG (400, 4.000, 6.000 e 10.000 g/mol), nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 15 % (p/v), todos dissolvidos em água a 80 °C. A preparação do fermentado submerso segue o processo de composição em g/dL de substratos: 4,0 g de farelo de trigo, 1,0 g de pectina cítrica, 0,005 g de extrato de levedura e o preparo dos inóculos em câmara de fluxo laminar, são preparadas suspensões de *Aspergillus orizae*. As soluções de PVA e de PEG foram adicionadas ao caldo pré-filtrado (pH 4,8) nas temperaturas de 0, 10 e 20 °C.

Após a adição do polímero, a amostra sob agitação por 15 minutos. Depois da precipitação, os tubos foram centrifugados duas vezes (4.000 rpm) por 10 minutos. O precipitado foi ressuspendido até o volume inicial. A determinação do conteúdo protéico total (método de Bradford) e atividade enzimática (método de Somogyi), no precipitado e no sobrenadante, por UV/visível, a 595 nm para as leituras de absorbância e convertidas para mg.mL⁻¹, com a ressuspensão de volume.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de PVA e de PEG, como polímeros não-iônicos, demonstrou que estes podem ser utilizados para algumas proteínas. Para todos os testes, o valor do pH do meio foi fixado através de correção com solução tampão, nunca extrapolando a faixa entre 4,2 e 4,8. Essa verificação foi necessária para evitar a desnaturação protéica precipitada que, estatisticamente, há maior incidência em valores fora dessa faixa. Dessa forma, pH não foi um parâmetro influenciador sob análise direta.

A eficiência no processo de precipitação é diretamente proporcional em relação à temperatura, ao peso molecular do polímero, à concentração polimérica e, até mesmo, à estrutura mono-polimérica.

Em relação à temperatura, foram encontrados os melhores resultados a 20 °C, independente do polímero e peso molecular (figura 1). Porém, verificou-se relação inversa com a manutenção da atividade molucular, sendo encontrados os melhores resultados, para todos os testes, a 0 °C (figura 2)

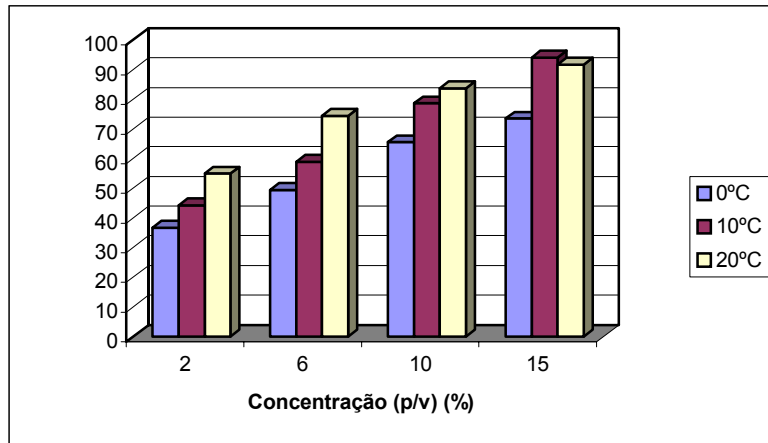


Figura 1: Porcentagem de conteúdos protéicos em relação ao valor inicial para o PVA 45.000 g/mol a diferentes temperaturas

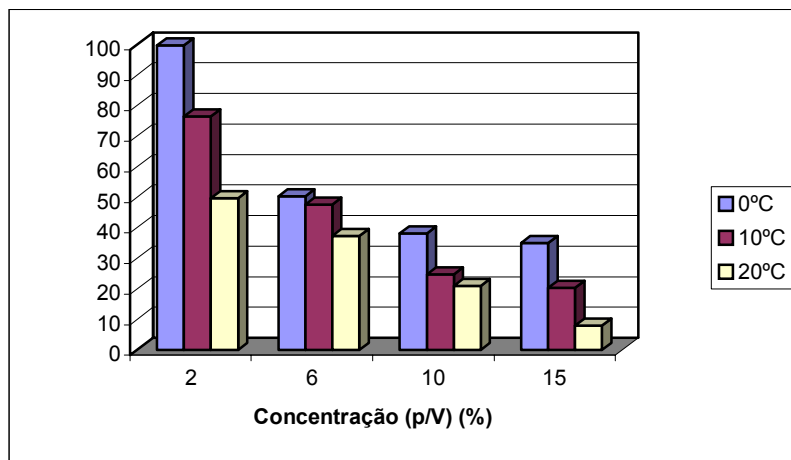


Figura 2: Porcentagem de atividades enzimáticas em relação ao valor inicial para o PVA 45.000 g/mol para diferentes temperaturas

Maiores pesos moleculares proporcionaram maior precipitação da enzima em estudo, em consequência, maior conteúdo protéico no precipitado. A mesma relação foi verificada para a concentração da solução. Quanto mais concentrada, promove maior precipitação. Nesse aspecto, todos os polímeros testados apresentaram precipitação positiva, com exceção do PEG 400 até 8% (p/v).

Em concentração de 15% (p/v), o PVA 80.000 g/mol proporcionou maior precipitação da proteína. Percebe-se, também uma ampla superioridade do PVA sobre o PEG, em praticamente todos os pesos moleculares testados (Figura 3).

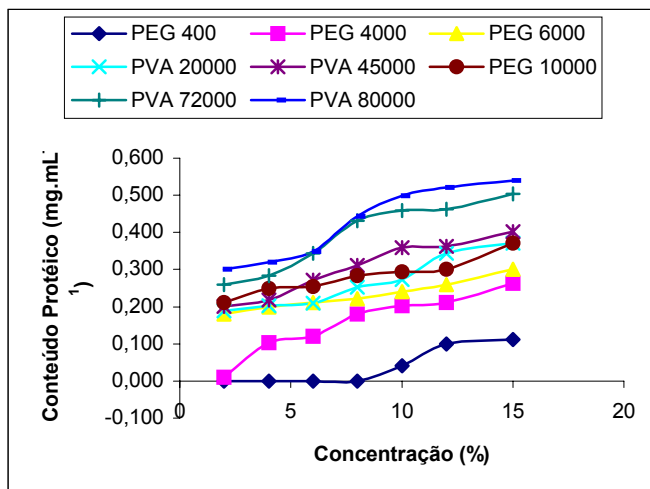


Figura 3.a. Conteúdo protéico no precipitado para diferentes soluções poliméricas ($C_i = 0,548 \text{ mg.mL}^{-1}$; $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$).

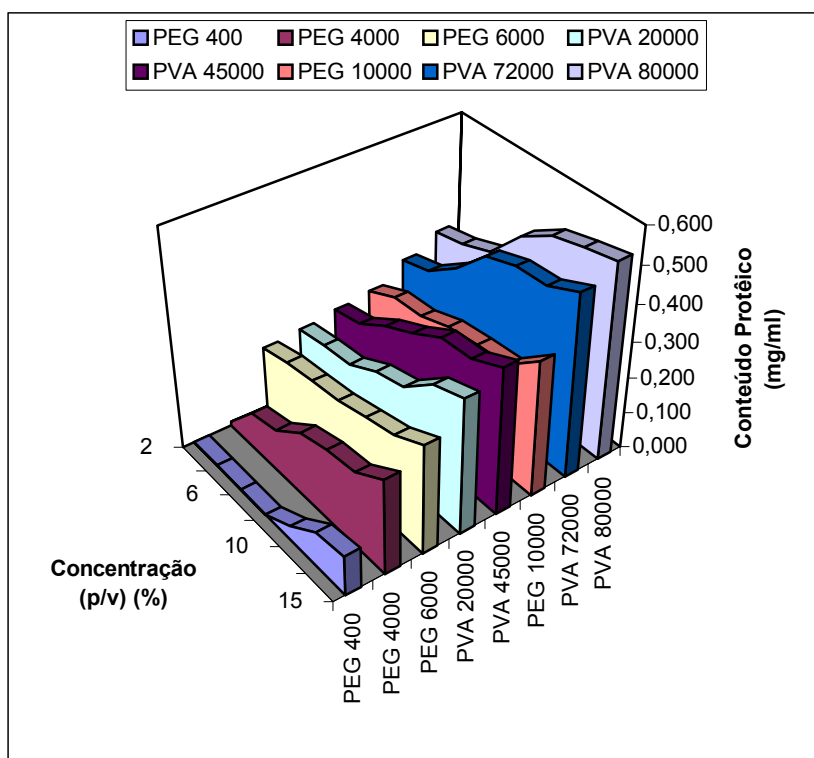


Figura 3.b. Representação tridimensional de conteúdo protéico no precipitado para diferentes soluções poliméricas ($C_i = 0,548 \text{ mg.mL}^{-1}$; $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Porém, a perda de atividade enzimática no precipitado decaiu à partir da concentração de 2%. O melhor resultado obtido foi a 0 °C, com o PEG 400, a 2% (p/v) (Figura 4). Porém, sua baixa capacidade de concentrar enzimas torna-o inviável. O PVA 20.000 além de proporcionar razoável concentração protéica, apresenta, entre os PVA testados, a melhor manutenção de atividade enzimática. Também nesse parâmetro, o PVA apresentou melhores resultados em relação ao PEG na faixa entre 2 e 8%. A partir dessa concentração, o PEG mostrou-se mais eficiente.

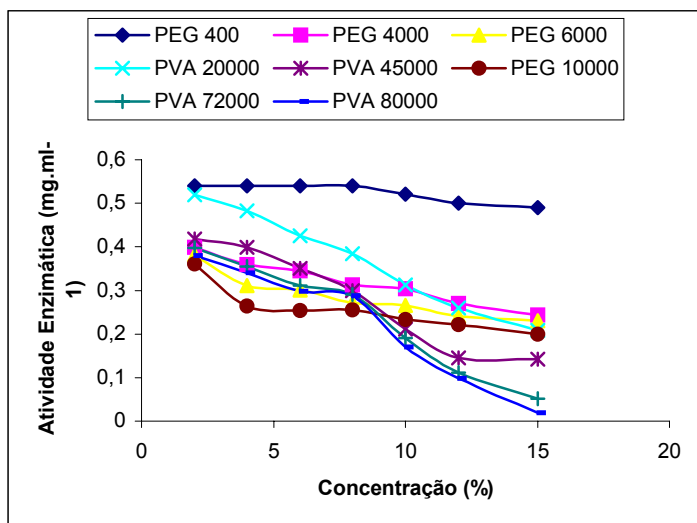


Figura 4. Comparação de atividade enzimática no precipitado entre os polímeros testados ($C_i = 0,548 \text{ mg.mL}^{-1}$; $T = 0 \text{ }^\circ\text{C}$).

A análise dos gráficos anteriores demonstra uma relação proporcionalmente inversa entre o conteúdo protéico e a atividade enzimática. Se um polímero apresentou bom resultado em relação à quantidade de proteínas que ele foi capaz de concentrar, por outro, ele acaba desnaturando a proteína, proporcionalmente, reduzindo a atividade enzimática e a tornando inviável. Esse fenômeno pode estar relacionado à estrutura helicoidal, tanto do PVA quanto do PEG. Adições de uréia podem recuperar parte dessa atividade perdida.

O PEG demonstrou um comportamento mais regular, sofrendo menores variações - tanto de conteúdo protéico quanto de atividade enzimática - com o aumento da concentração. O PVA, por outro lado, apresentou uma amplitude grande entre seus menores e maiores resultados.

Nas concentrações baixas (2%), ocorreram as mais elevadas atividades enzimáticas para todos os polímeros, porém, os mais baixos conteúdos protéicos (figura 5).

Nas concentrações intermediárias (8%), verificou-se uma tendência ao equilíbrio entre conteúdos protéicos e atividades enzimáticas (figura 6).

Nas elevadas concentrações (15%), os polímeros testados demonstraram o ápice dos conteúdos protéicos, proporcionais aos seus pesos moleculares, porém, perda significativa de atividade enzimática (figura 7).

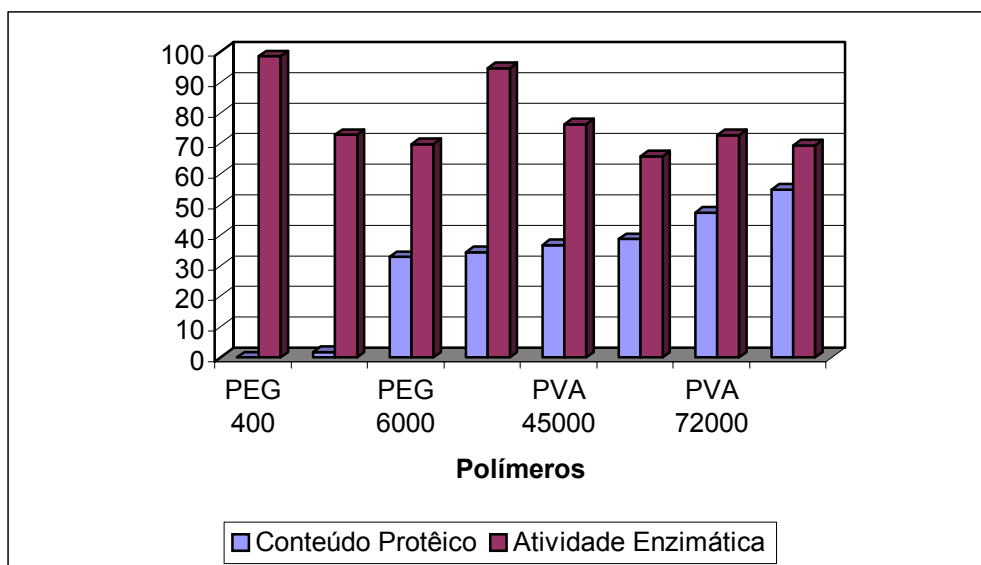


Figura 5. Porcentagem de conteúdo protéico e de atividade enzimática em relação ao valor inicial ($C_i = 0,548 \text{ mg.mL}^{-1}$) ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ a 2% (p/v)).

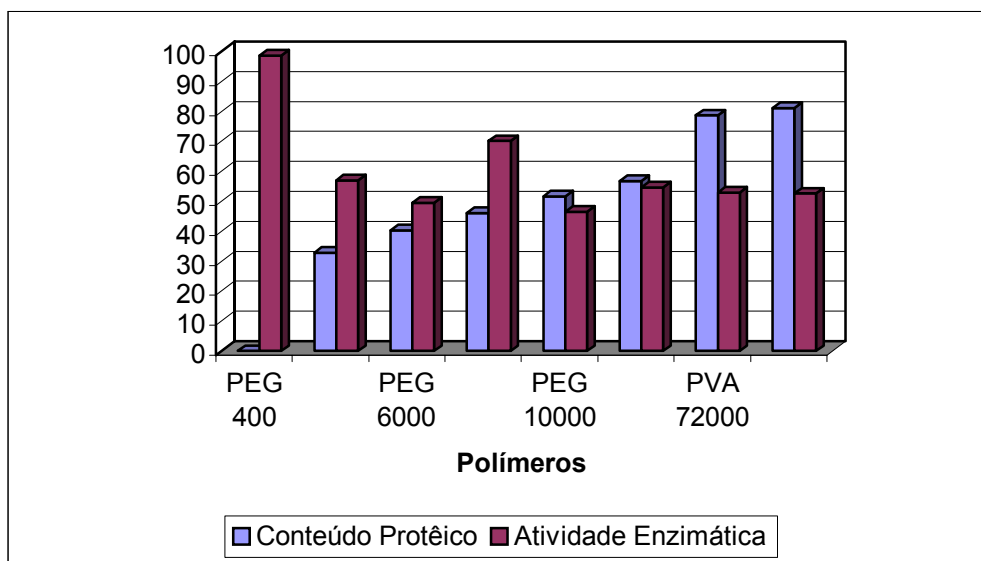


Figura 6. Porcentagem de conteúdo protéico e de atividade enzimática em relação ao valor inicial ($C_i = 0,548 \text{ mg.mL}^{-1}$) ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ a 8% (p/v)).

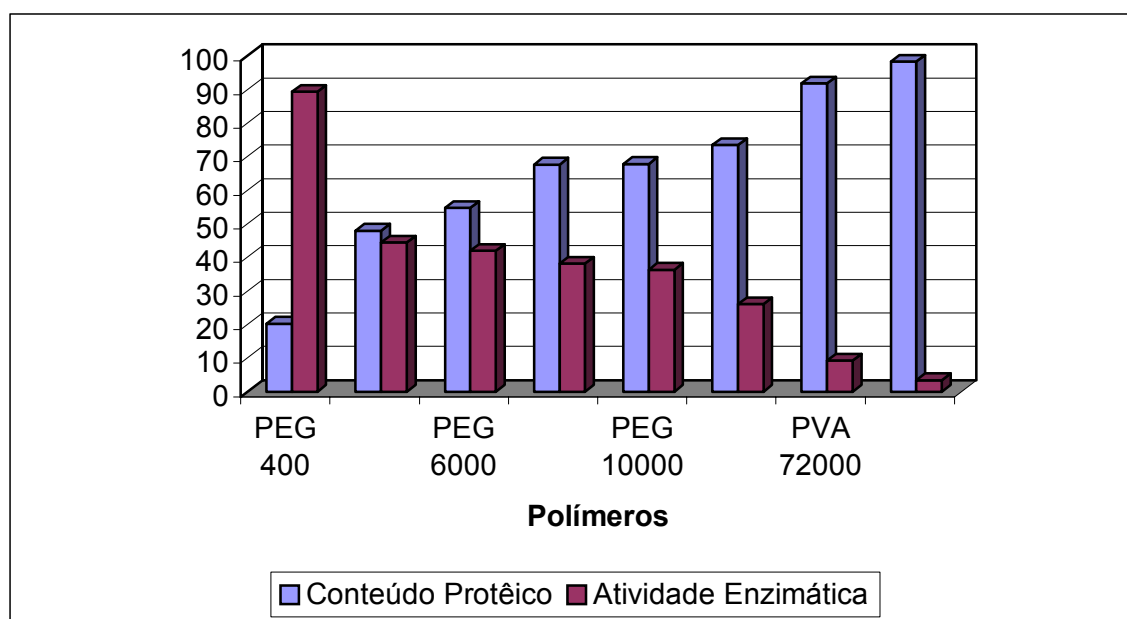


Figura 7. Porcentagem de conteúdo protéico e de atividade enzimática em relação ao valor inicial ($C_i = 0,548 \text{ mg.mL}^{-1}$) ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ a 15% (p/v))

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a viabilidade de uso do PVA e do PEG como agentes precipitantes para pectinases, tendo sua atividade dependência com: a concentração, peso molecular e temperatura.

O uso de PVA e PEG, demonstram ter capacidade de precipitação das enzimas pectinolíticas (nas temperaturas de $0 \text{ }^\circ\text{C}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), com exceção do PEG 400, o qual não precipita a proteína com concentrações abaixo de 8%.

Os dados demonstraram que há maior precipitação de pectinas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ com 15% de PVA 72.000 g/mol e menor desnaturação protéica com PEG 400. Este, porém, apresenta baixo índice de concentração protéica. PVA 20.000 g/mol a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ e a 2% também é muito eficiente, apresentando, porém capacidade de precipitação.

O PEG 10.000 e o PVA 20.000 g/mol apresentam a melhor relação entre os parâmetros conteúdo protéico-atividade enzimática.

Os ensaios demonstraram que à medida em que a proteína vai sendo concentrada, o polímero a desnatura, reduzindo consideravelmente a atividade. Essa tendência foi verificada em todos os ensaios, com maior acentuação para os de PVA.

Técnicas de separação e recuperação de atividade enzimática serão necessárias para complementar esse estudo e tornar o PVA um poderoso agente de precipitação comercial, em função de sua melhor relação custo-benefício relacionado aos outros métodos.

Agradecimentos. Os autores agradecem a UCS e FAPERGS pelo apoio.

BIBLIOGRAFIA

1. P.J.H Daas, B. Boxma y A.M.C.P. Hofman,; **et al.** Biopolym, 5º edición (2001), 1-8.
2. Scopes, R.K. Separation by Precipitation, cap. 4, 71-101 (1997)
3. Schuler, M.L. Bioprocess Engineering: Basic Concepts. PTR Prentice Hall, inc. Englewood Clifs, New Jersey – USA, 2002, páginas 311-362.