

OTIMIZAÇÃO DA PARTIÇÃO DE ENZIMAS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Rebeca de Andrade, TABOSA ¹; Renata Cristina Ferreira, BONOMO ²

Resumo

As proteases são enzimas que catalisam as reações de hidrólise das moléculas de proteínas, convertendo-as em peptídeos e aminoácidos. A aplicação de proteases é de interesse da indústria de alimentos e o gengibre é uma das fontes vegetais que pode ser utilizada para extração de proteases, especificamente a zingibain. Uma das suas aplicações é na melhoria da textura da carne e para mudanças em propriedades funcionais das proteínas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi extrair, caracterizar e particionar em SAB as proteases do gengibre. A melhor condição para a atividade enzimática foi em pH 3,0 na temperatura de 30°C. Os resultados obtidos de coeficiente de partição da proteína e de atividade enzimática mostram que a maioria das proteínas e proteínas com atividade enzimática concentrou-se na fase superior, visto que K_e e K_p foram iguais a 3,128 e 3,293, respectivamente. A concentração de 15% PEG e 10% Sal foi a que proporcionou melhor resultado tendo as maiores concentrações na fase.

Palavra Chave: Enzima, protease.

OPTIMIZATION OF ENZYME PARTITION IN AQUEOUS BIPHASIC SYSTEMS

ABSTRACT

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis reactions of protein molecules, converting them into peptides and amino acids. The application of proteases is of interest to the food industry and ginger is one of the plant sources from which it can be used to extract proteases, specifically zingibain. One of its applications is in the improvement of meat texture and for changes in the functional properties of proteins. Therefore, the objective of this work was to extract, characterize and partition the ginger proteases into SAB. The best condition for enzymatic activity was at pH 3.0 at 30°C. The results obtained for the protein partition coefficient and enzymatic activity show that most proteins and proteins with enzymatic activity were concentrated in the upper phase, since K_e and K_p were equal to 3.128 and 3.293 respectively. The

1. Universidade Estadual do Suldoeste da Bahia(UESB); Graduanda em Engenharia de Alimentos.
2. Departamento de Tecnologia Rural e Animal- UESB

concentration of 15% PEG and 10% Salt was the one that obtained the best result with the highest concentrations in the phase.

Keywords: Enzyme, protease.

INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que atuam especificamente sobre as ligações peptídicas das proteínas e constituem o grupo de maior importância na indústria, uma vez que correspondem a 60% do comércio mundial de enzimas. Elas estão amplamente distribuídas nos organismos vivos (plantas, animais e microrganismos) onde desempenham importante papel nutricional e regulatório (4).

Devido à importância das proteases para diversos setores da indústria, há uma demanda crescente nas pesquisas voltadas à obtenção de novas fontes, bem como nos processos de purificação e caracterização destas enzimas. A purificação das proteínas requer sua separação do meio ou do extrato bruto utilizado para a manutenção das biomoléculas. O produto geralmente está presente em níveis baixos e também precisa ser concentrado. A extração de proteínas em sistemas aquosos bifásicos (SABs) é um procedimento rápido que evita a maioria dos problemas de desnaturação de moléculas frágeis em esferas cromatográficas (5, 6).

Para ter um alto rendimento, recuperação e também um bom fator de purificação para uma proteína, uma composição do SAB deve ser selecionada. As composições de sistemas desejáveis são aquelas que promovem valores elevados para os coeficientes de partição (K), onde a proteína alvo é extraída, principalmente, em uma das fases e os principais contaminantes são extraídos na outra fase. O coeficiente de partição de uma substância, K, é definido como a razão entre a concentração da substância particionada na fase superior e a concentração na fase inferior: valores acima de 1 indicam que a proteína alvo foi particionada para a fase superior, e quando os valores de K são menores que 1, indicam a partição da proteína para a fase inferior (1,2).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto: Os rizomas utilizados para a realização desta pesquisa foram de supermercados locais, no município de Itapetinga-Ba. Para o processo de extração foi feita a lavagem e posteriormente o corte do gengibre, em pequenos pedaços, e maceração em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (2:1), seguida de filtração e centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos.

Determinação do teor de proteína e atividade enzimática: Para quantificar o teor de proteínas no extrato bruto enzimático, utilizou-se metodologia proposta por Bradford (1976). Como padrão foi utilizada a albumina soro bovina (BSA).

Para medir a atividade enzimática, 0,4 mL foram adicionados à 2ml de caseína 1% em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,0 e incubado em banho termostático a 37°C por 10 minutos. Para parar a reação foi utilizado 2 mL de ácido tricloroacético 10% e em seguida centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos. Por fim, foi feita a absorbância do sobrenadante medida a 280 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de tirosina equivalente por minuto.

Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática: A atividade enzimática foi determinada como descrito acima, porém variando a temperatura de 20 a 70°C, tendo um intervalo de 10°C. O maior valor de valor de atividade enzimática foi assumido como 100%, e as outras atividades calculadas em termo de atividade residual (%). Os estudos de pH foram realizados na melhor condição de temperatura para a atividade enzimática. Para isso, a solução de caseína foi preparada em diferentes valores de pH, variando de 3 a 11. a 5,0, fosfato de sódio para o pH de 6,0 e 7,0; Tris-HCl para pH de 8,0 e 9,0; carbonato de sódio-bicarbonato de sódio para o pH de 10 a 11. O maior valor de valor de atividade enzimática foi assumido como 100%, e as outras atividades calculadas em termo de atividade residual (%).

Partição em sistemas aquosos bifásicos (SAB): Os SAB utilizados neste trabalho foram constituídos de polietilenoglicol (PEG) 4000 g/mol e fosfato de potássio em pH 7,0. As concentrações para o preparo dos sistemas estão presentes na Tabela 1. Para a partição das proteases de gengibre, foram preparados SAB de 10 g. Em todos os sistemas foram adicionados 2,0 g de extrato bruto, e então calculadas as quantidades necessárias de sal e PEG. Após a adição do extrato e das quantidades necessárias dos constituintes do sistema, os tubos foram agitados e permaneceram em estufa B.O.D por 12h a 25°C. Por fim, as fases inferior e superior foram coletadas com auxílio de uma agulha e seringa e armazenadas para a determinação do teor de proteínas e atividades proteolíticas, e calculados os parâmetros de partição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A melhor condição de temperatura e pH para atividade enzimática foi a 30°C e pH 3,0, respectivamente. Os resultados obtidos para o coeficiente de partição de proteína e atividade, e a seletividade estão apresentados na Tabela 1. A partir do coeficiente de partição é possível inferir para qual das fases a enzima de interesse, e

outras proteínas, foram particionadas preferencialmente. Todos os valores de K_p e K_e encontrados foram maiores que 1,0, o que demonstra a partição preferencial das proteases e de outras proteínas para a fase superior. Os melhores resultados para a partição de proteases foi utilizando o SAB formado por 15% de PEG e 10% de sal ($K_e=3,293$). Verificou-se que o aumento dos componentes do sistema pode favorecer a interação entre os componentes da fase superior e as proteases, visto maior valor de K_e . Entretanto, para a 3ª linha de amarração há redução de K_e . Este comportamento pode estar associado ao efeito do volume de exclusão que ocorre como resultado do aumento da concentração de PEG. Como consequência, as proteases foram particionadas preferencialmente para fase inferior. Os resultados de seletividade devido sistema de PEG 17% e 11% Sal que apresenta mais proteína na fase superior, sendo que na fase inferior também apresenta proteína só que em menor quantidade a seletividade teve o resultado bem abaixo de um o que é satisfatório (3).

Com relação a energia livre de transferência, os valores menores que 1 mostram que a migração das proteases para a fase superior foi um processo espontâneo, devido a maior afinidade entre as proteases e o PEG (7).

Tabela 1. Parâmetros de partição de proteases de gengibre em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG (4000 g/mol) + fosfato de potássio a 30°C.

Linha de amarração	Composição do SAB	K_p	K_e	Seletividade	Energia livre de transferência de Gibbs (ΔG)
1	13% PEG + 9% Sal	2,101	1,646	0,871	-1,461
2	15% PEG + 10% Sal	3,128	3,293	1,119	-2,859
3	17% PEG + 11% Sal	3,602	1,272	0,367	-0,562

CONCLUSÃO

Com o objetivo de extrair e caracterizar a protease do gengibre em diferentes concentrações de PEG e Sal a melhor concentração foi 15% PEG e 10% de Sal onde a concentração de proteína e proteínas enzimática teve melhor resultado na fase superior do sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves, Annie Nolasco, et al. Extraction of protease from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) and partial purification in polyethylene glycol +

- sodium phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Food Processing and Preservation* 46.2,2022.
2. BARANI, Alireza et al. Influence of the molecular weight of polymer, temperature and pH on phase diagrams of poly (ethylene glycol)+ di-potassium tartrate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 459, 1-9, 2018.
 3. CASCONE, O., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb.Technol*, 13: 629-635, 1991.
 4. DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. *Química de alimentos de Fennema*. Artmed editora, 2018.
 5. BATISTA, Izabella de Carvalho et al. Influence of the presence of dioctyl sulfosuccinate sodium as adjuvant on the equilibrium data of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol+ potassium phosphate+ water at 298.15 K. *Chemical Engineering Communications*, 208, 11,1630-1639, 2021.
 6. LEVISSON M., SPRUIJT R.B., WINKEL I.N., KENGEN S.W., VAN DER OOST J. *Protein Downstream Processing*. Totowa, NJ: Humana Press, v. 1129, 2014.
 7. SILVA L. H. M., LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, p. 1345-1351, 2006.