

Área: Engenharia de Alimentos

**USO COMBINADO DA ELUIÇÃO DEGRAU E LINEAR NA
PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE
TROCA IÔNICA EM COLUNA DE LEITO EXPANDIDO**

**Danielle Specht Malta*; Laís Reginatto; Gabrielle Victoria Gautério;
Jaqueline Garda Buffon; Susana Juliano Kalil**

*Laboratório de Microbiologia e Biosseparações, Escola de Química e Alimentos,
Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS*

**E-mail: daniellesjnfurg@gmail.com*

RESUMO – As peroxidases são enzimas capazes de catalisar reações de óxido-redução de substratos orgânicos. Essas enzimas possuem diversas aplicações e, dependendo da sua finalidade, é necessário que as mesmas sejam submetidas ao processo de purificação. Dentre as técnicas existentes destaca-se a cromatografia de troca iônica (CTI) em coluna de leito expandido, a qual oferece vantagens como maior produtividade de processo, maior interação entre a matriz ligante e a molécula de interesse, e possibilidade de aumento de escala. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso combinado da eluição do tipo degrau e linear na purificação da peroxidase de farelo de arroz através da CTI em coluna de leito expandido. Como resultado, o uso combinado da eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,15 a 1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5, proporcionou fator de purificação e recuperação enzimática de 13,7 vezes e 43,4%, respectivamente.

Palavras-chave: farelo de arroz, fator de purificação, Streamline™ SP, oxidoredutases, recuperação enzimática.

1 INTRODUÇÃO

As peroxidases (CE 1.11.1.X) são enzimas que catalisam a oxidação de diversos substratos orgânicos graças a vários peróxidos que atuam como receptores de elétrons (FAWAL et al., 2013). Essas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser extraídas de vegetais, tecidos animais e alguns fungos (BALASUBRAMANIAN; BOOPATHY, 2013). Inúmeras aplicações são atribuídas às peroxidases em áreas como biomédica, clínica, biotecnológica e industrial (SOMTÜRK; RAMAZAN; ÖZDEMIR, 2014), no entanto, dependendo do seu uso final, é necessário que as mesmas sejam submetidas a um processo de purificação.

Diversas técnicas têm sido empregadas na purificação de peroxidases, tais como precipitação por sais (KHARATMOL; PANDIT, 2012), solventes orgânicos (SINGH; PRAKASH; SHAH, 2012) ou polieletrólitos

(VALETTI; PICÓ, 2013), ultrafiltração, sistema aquoso bifásico (SRINIVAS; BARHATE; RAGHAVARAO, 2002), partição trifásica (VETAL; RATHOD, 2014) e processos cromatográficos em geral (GONG et al., 2015). Recentemente, o uso da CTI em coluna de leito expandido se mostrou como alternativa na purificação de peroxidases através de um único processo, proporcionando a purificação da peroxidase em 2,4 vezes e recuperação dessas enzimas em até 41% (GAUTÉRIO et al., 2015). O estudo da etapa de eluição na CTI pode proporcionar a obtenção de peroxidases mais puras e com maior recuperação das mesmas. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso combinado da eluição do tipo degrau e linear purificação da peroxidase por CTI em coluna de leito expandido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato clarificado de peroxidase

A extração de peroxidase foi realizada a partir de farelo de arroz integral (granulometria inferior a 0,425 mm) e solução tamponante fosfato de sódio 0,040 mol/L em pH 5,0, na proporção 1:10, respectivamente. O extrato permaneceu sob agitação orbital (100 rpm) a 25°C, durante 60 min. Após, o extrato foi centrifugado (3300xg) a 4°C por 10 min, e filtrado em sistema a vácuo, tendo-se assim o extrato clarificado de peroxidase (FELTRIN, 2013).

2.2 Purificação de peroxidase por CTI em coluna de leito expandido

A purificação da peroxidase por CTI em coluna de leito expandido foi realizada conforme Gautério et al. (2015). A coluna contendo 10 cm de leito de resina Streamline™ SP foi equilibrada com solução tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 de modo a obter um leito estável no grau de expansão de 2,5. Em seguida, foi feita a alimentação em fluxo ascendente do extrato clarificado de peroxidase diluído 1:1 e ajustado no pH 4,5.

A etapa de lavagem foi realizada com o mesmo tampão de equilíbrio da resina, porém em pH 5,5. Esta etapa se procedeu até que a absorvância a 280 nm fosse menor que 0,05 e permanecesse constante. Na eluição, o adaptador foi movido até a posição 10 cm e esta foi feita em modo fixo e fluxo descendente a 100 cm/h por quatro volumes de coluna. As condições de eluição nos três ensaios realizados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de eluição avaliadas na purificação de peroxidase por CTI em leito expandido.

Ensaio	Eluição
1	Gradiente linear salino de 0 a 1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5
2	Degrau de 0,1 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,1 a 1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5
3	Degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,15 a 1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5

Em todo processo de purificação, frações foram coletadas na saída da coluna e submetidas à medição do volume (mL), atividade enzimática (U/mL), concentração de proteínas (mg/mL), leitura da absorvância à 280 nm e pH. A eficiência do processo foi determinada pelo cálculo do fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC), conforme as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$FP = \frac{A_{eEP}}{A_{eEI}} \quad (1) \quad REC(\%) = \frac{A_{tEP}}{A_{tEI}} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde A_{eEP} é a atividade específica (U/mg) do extrato enzimático purificado; A_{eEI} é a atividade específica do extrato enzimático clarificado inicial; A_{tEP} é a atividade total (U) do extrato enzimático purificado; e A_{tEI} é a atividade total do extrato enzimático clarificado inicial.

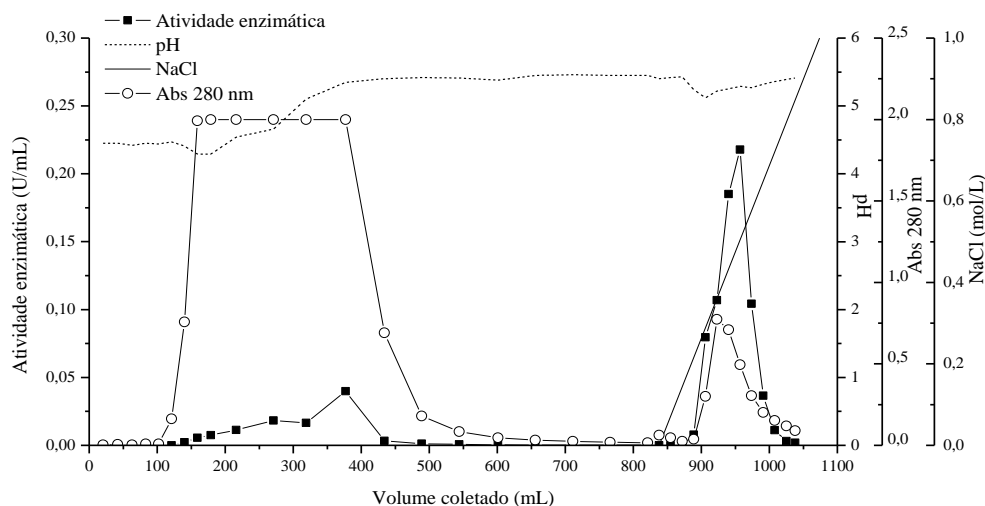
2.3 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas

A atividade enzimática de peroxidase foi determinada conforme Devaiah e Shetty (2009) com modificações. A 1 mL de extrato enzimático, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,005 mol/L em pH 5,5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. A mistura reacional permaneceu em banho termostático a 25°C por 20 min. Após, a transmitância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm. Uma unidade da atividade de peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de guaiacol ($\epsilon = 26600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) em 1 min. A concentração de proteínas foi determinada segundo Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

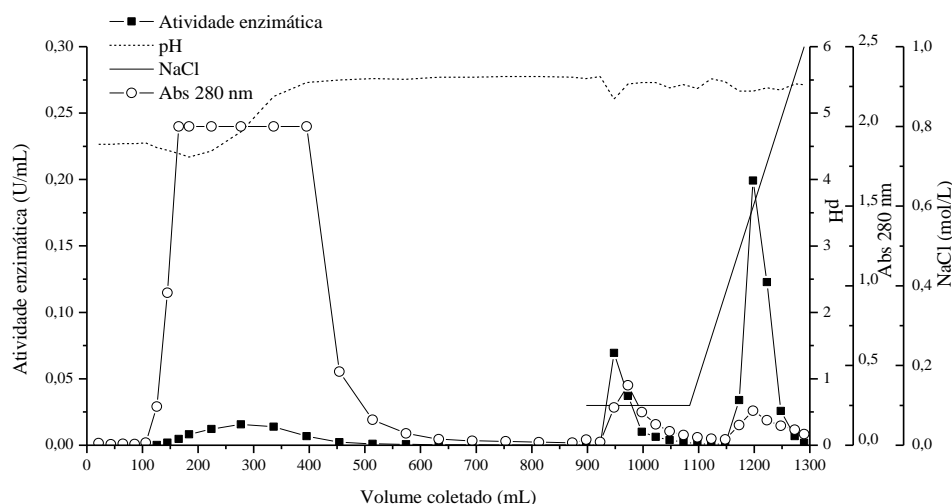
A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido no primeiro ensaio de purificação de peroxidase.

Figura 1 – Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição gradiente linear salino 0-1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 1).



Conforme mostra a Figura 1, o início da eluição tanto da peroxidase quanto de outras proteínas presentes no extrato enzimático ocorre em baixas concentrações salinas (menores que 0,2 mol/L), porém o pico máximo de eluição para estas biomoléculas se distingue (0,4 e 0,5 mol/L para as proteínas contaminantes e peroxidase, respectivamente). Além disso, a eluição das proteínas contaminantes provocou a diminuição do pH do meio, o que pode levar à desnaturação da peroxidase e, conseqüentemente, menor recuperação da mesma. O uso da eluição em modo linear (Ensaio 1) proporcionou a obtenção de peroxidase purificada em 4,8 vezes com REC de 50,6%. Visando a separação dos picos de eluição das proteínas contaminantes e de interesse, bem como o aumento da eficiência do processo de purificação por CTI, ensaios de purificação utilizando a combinação da eluição dos tipos degrau e linear foram realizados, e o resultado é apresentado nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 – Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,1 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,1-1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 2).

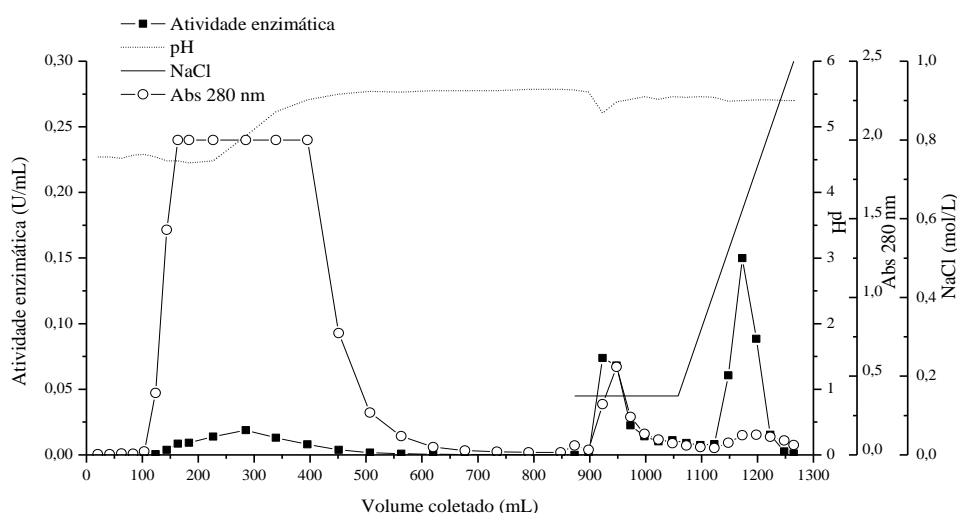


Segundo Morais e Kalil (2009), a combinação da eluição dos tipos degrau e linear pode proporcionar a remoção de algumas proteínas contaminantes ligadas fracamente ao trocador iônico, levando à maior purificação da biomolécula de interesse. Braga, Lemes e Kalil (2014) também constataram que o uso desta combinação proporcionou maior FP na purificação da enzima β -galactosidase. De acordo com as Figuras 2 e 3, o uso da eluição do tipo degrau proporcionou a separação dos picos das proteínas contaminantes e de interesse, o que não ocorria quando utilizado somente a eluição em modo linear. Os cromatogramas também mostram que a separação dos picos também evita possíveis desnaturações da enzima de interesse causada pela acidez do meio, já que não foi observada a queda de pH durante a eluição de grande parte das isoenzimas de peroxidases.

Os ensaios adicionados da eluição em modo degrau proporcionaram maior purificação da peroxidase, porém menor recuperação da mesma. Valores de FP e REC foram de 9,4 vezes e 45,1% para o Ensaio 2, enquanto que no Ensaio 3 estes valores corresponderam 13,7 vezes e 43,4%. A diminuição do percentual de REC nos Ensaios 2 e 3 em relação ao Ensaio 1 pode estar associada com a eluição de algumas isoenzimas de peroxidase juntamente às demais proteínas presentes no extrato enzimático, já que ambas são capazes de eluir em baixas concentrações salinas. No entanto, o uso combinado da eluição dos tipos degrau e linear ainda se

mostra vantajoso, pois proporcionou a eluição das proteínas contaminantes e posterior eluição de grande parte das isoenzimas de peroxidase, obtendo-se assim maiores valores de FP.

Figura 3 – Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,15-1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 3).



Em ambos os ensaios acrescidos da eluição do tipo degrau, grande parte das isoenzimas de peroxidase foram eluídas em concentrações salinas próximas a 0,6 mol/L. Apesar da perda das isoenzimas de peroxidase durante a eluição do tipo degrau ter sido maior no Ensaio 3 (20,7%) do que no Ensaio 2 (14,3%), esta é compensada pelo aumento nos valores de FP sem afetar consideravelmente os percentuais de REC. Portanto, as condições de eluição utilizadas no Ensaio 3 se mostram mais favoráveis à purificação de peroxidases.

Em estudo prévio de purificação de peroxidases por CTI em coluna de leito expandido, Gautério et al. (2015) avaliaram alguns parâmetros relacionados à etapa de adsorção, porém mantiveram a eluição em modo gradiente. Os autores alcançaram valores de FP (2,4 vezes) e REC (41%) inferiores aos demonstrados no presente estudo, o que mostra a importância do uso combinado da eluição dos tipos degrau e linear sob a eficiência do processo de purificação de peroxidases.

4 CONCLUSÃO

Na purificação de peroxidases por CTI em coluna de leito expandido, o uso combinado da eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e do gradiente linear salino 0,15-1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5, proporcionou FP e REC de 13,7 vezes e 43,4%, respectivamente.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Capes, CNPQ, PDE/EPEM – FURG.

6 REFERÊNCIAS

- BALASUBRAMANIAN, M.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos nucifera* (L.): biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 33-42, 2013.
- BRAGA, A.R.C.; LEMES, C.A.; KALIL, S.J. Single chromatographic step for β -galactosidase purification: influence of salt and elution parameters. **Separation Science and Technology**, v. 29, p. 1817-1834, 2014.
- DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.
- FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. 2013.120 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- FAWAL, N.; LI, Q.; SAVELLI, B.; BRETTE, M.; PASSAIA, G.; FABRE, M.; MATHE, C.; DUNAND, C. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 441-444, 2013.
- GAUTÉRIO, G.V.; FERNANDES, S.S.; MOLON, F.O.; SILVEIRA, F.S.; BUFFON, J.G.; KALIL, S.J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 153-164, 2015.
- GONG, Z; LI, D; LIU, C; CHENG, A; WANG, W. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chesnut kernel. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, p. 1095-1099, 2015.
- KHARATMOL, P.P; PANDIT, A.B. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica oleracea* var. *capitata*). **Journal of Biochemical Technology**, v. 4, p. 531-540, 2012.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5312-5317, 2009.
- SINGH P.; PRAKASH, R.; SHAH, K. Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: prospects for enzyme based applications. **Talanta**, v. 97, p. 204-210, 2012.
- SOMTÜRK, B.; KALIL, R.; ÖZDEMİR, N. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 1815-1828, 2014.
- SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 1-6, 2002.
- VALETTI, N.W.; PICÓ, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 119, p 1-6, 2013.
- VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 284-289, 2014.