UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

PECTINESTERASE DO MAMÃO (*Carica papaya* L.)

ADELAIDE TIE CATUTANI

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. EUCLIDES J. LOURENÇO

São Paulo
1982

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Euclides J. Lourenço, pela dedicação com que orientou o desenvolvimento deste trabalho; ao Prof. Hugo Cândido de Oliveira da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto que propiciou esta iniciação à pesquisa; ao Prof. Franco M. Lajolo, atual Coordenador do Curso de Pós-Graduação; ao Prof. José Paschoal Batistutti e ao Prof. Valdir Augusto Neves, pela incessante colaboração e apoio; ao Prof. José de Souza Leão, pelos estímulos e sugestões na parte experimental; à Glória Maria Lemos da Silva, pelo constante apoio e compreensão; ao Prof. Alfredo Tenuta Filho, pela valiosa colaboração, em especial, durante a redação do texto; aos colegas do Curso de Pós-Graduação, com menção especial ao Prof. Armando Sabaã Srur, pela amizade e apoio; ao Prof. Rubens Rosa do Departamento de Bioquímica e aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelos ensinamentos recebidos; ao Sr. Lázaro Albino de Souza e à Silvia Tassinari De Felice, pelo apoio e compreensão; à Loanda d'Eurydice e à Benedita E. S. de Oliveira, pela constante atenção e colaboração recebida; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de formação concedida nos anos de 1980, 1981 e 1982; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelos auxílios financeiros recebidos e a todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

AE	atividade específica
BSA	albumina de soro bovino
DEAE-celulose	dietilaminoetil celulose
DO_{280}	densidade óptica a 280 nm
DTE	ditioeritritol
EDTA	etileno diamino tetracetato de sódio
g	grama
I	concentração de inibidor
K_i	constante de dissociação enzima-inibidor
K_m	constante de dissociação enzima-substrato
log	logarítmo
M	concentração molar
μ eq	microequivalente
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
nm	nanometros
PE_U	unidades de atividade da pectinesterase
PM	peso molecular
Policlar AT	polivinilpirrolidona insolúvel
rpm	rotações por minuto
S	concentração de substrato
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina

$T^{\circ}\text{C}$	temperatura em grau Cēlsius
V	velocidade
V_e	volume de eluição.
$V_{m\bar{x}}$	velocidade máxima
V_o	volume vazio

SUMÁRIO

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	6
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 - Materiais	7
3.1.1 - Amostras	7
3.1.2 - Reagentes	7
3.1.2.1 - Reagentes para extração e pu rificação	7
3.1.2.2 - Reagentes para determinação de substâncias pecticas	8
3.1.2.3 - Resinas para purificação ...	8
3.1.2.4 - Reagentes para determinação de peso molecular e proteína	8
3.1.2.5 - Reagentes para eletroforese.	9
3.1.2.6 - Inibidores	9
3.2 - Métodos	9
3.2.1 - Preparo das amostras	9
3.2.2 - Extração da pectinesterase	10
3.2.3 - Extração de substâncias pecticas	11
3.2.4 - Determinação de atividade da pectines- terase	11
3.2.5 - Determinação de proteína	12
3.2.6 - Otimização das condições de extração da pectinesterase	12
3.2.6.1 - Efeito da relação massa/volu me	12
3.2.6.2 - Efeito da concentração de NaCl	12

3.2.6.3 - Efeito de agentes protetores ..	13
3.2.6.4 - Efeito do Triton X-100 na extração do sedimento	13
3.2.7 - Purificação da pectinesterase	13
3.2.7.1 - Fracionamento com sulfato de amônio	13
3.2.7.2 - Cromatografia em DEAE-celulose.	14
3.2.7.3 - Cromatografia em Sephadex G-100	14
3.2.8 - Ensaio de caracterização da pectinesterase purificada	14
3.2.8.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida	14
3.2.8.2 - Determinação de peso molecular.	15
3.2.8.3 - Influência do pH na atividade enzimática	15
3.2.8.4 - Efeito da concentração de NaCl na atividade enzimática	15
3.2.8.5 - Efeito de íons mono e divalentes na atividade enzimática em função do pH	15
3.2.8.6 - Determinação da temperatura ótima	16
3.2.8.7 - Estabilidade térmica	16
3.2.8.8 - Influência do pH na estabilidade térmica	16
3.2.8.9 - Influência de NaCl na estabilidade térmica	16
3.2.8.10 - Estabilidade ao congelamento ..	16
3.2.8.11 - Linearidade de reação	17
3.2.8.12 - Determinação de constante cinética	17
3.2.9 - Estudos de inibição	17
3.2.9.1 - Determinação de tipo e constante de inibição	17

3.2.9.2 - Inibidores da pectinesterase	17
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 - Atividade enzimática e substâncias pecticas	18
4.2 - Otimização das condições de extração da pectines_ terase	21
4.2.1 - Relação massa/volume	21
4.2.2 - Efeito da concentração de NaCl	22
4.2.3 - Efeito de agentes protetores	24
4.2.4 - Efeito do Triton X-100 na extração do se_ dimento	24
4.3 - Purificação da pectinesterase	26
4.3.1 - Fracionamento com sulfato de amônio	26
4.3.2 - Cromatografia em DEAE-celulose	28
4.3.3 - Cromatografia em Sephadex G-100	30
4.4 - Ensaios de caracterização da pectinesterase puri_ ficada	32
4.4.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida ..	32
4.4.2 - Determinação de peso molecular	34
4.4.3 - Influência do pH na atividade enzimática	36
4.4.4 - Efeito da concentração de NaCl na ativi- dade enzimática	38
4.4.5 - Efeito de íons mono e divalentes na ati- vidade enzimática em função do pH	38
4.4.6 - Determinação da temperatura ótima	41
4.4.7 - Estabilidade térmica	41
4.4.8 - Influência do pH na estabilidade térmica	44
4.4.9 - Influência de NaCl na estabilidade térmi_ ca	46
4.4.10 - Estabilidade ao congelamento	46
4.4.11 - Linearidade de reação	48
4.4.12 - Determinação de constante cinética	51

	pág.
4.5 - Estudos de inibição	54
4.5.1 - Determinação de tipo e constante de inibi_	
ção	54
4.5.2 - Inibidores da pectinesterase	54
5 - CONCLUSÕES	59
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ABSTRACT	67

1 - INTRODUÇÃO

A fisiologia pós-colheita de frutos tropicais e sub-tropicais tem recebido atenção quanto ao metabolismo e as transformações que ocorrem com determinadas enzimas, açúcares, ácidos orgânicos e outros constituintes, durante o amadurecimento. Certos frutos, após a colheita, apresentam modificações características, relacionadas com a cor, textura, aroma e composição⁽¹²⁾.

Dentre os frutos tropicais, o mamão, de constituição frágil, requer cuidados especiais na sua colheita, tanto para o consumo "in natura" como para processamento. Além da mudança de cor, do verde para o amarelo, uma das características do seu amadurecimento, é o amolecimento gradativo associado às variações nas substâncias pecticas, promovidas por enzimas⁽⁴⁸⁾.

Por esse motivo, a demetilação e depolimerização de protopectina (substância pectica insolúvel) formando polímeros de baixo peso molecular (formas solúveis), são consideradas fatores importantes no mecanismo de amaciamento do fruto⁽²⁴⁾.

A pectinesterase (E.C. 3.1.1.11) é uma das enzimas envolvidas neste mecanismo, estando largamente distribuída no tecido vegetal^(17,18,44). Localizada na parede celular, catalisa a hidrólise da ligação éster de substâncias pecticas em álcool metílico e ácido pectínico ou pectico⁽¹⁾.

Acredita-se que a enzima esteja relativamente inativa em muitos tecidos vegetais intactos, porém, quando os mesmos são injuriados ou macerados, a esterase rapidamente converte pectinas a ácido pectico^(43,59). Assim, o isolamento e a caracterização da pectinesterase pode levar a um melhor entendimento da fisiologia e patologia do fruto, contribuindo ainda para um maior controle de certos processos tecnológicos, nos quais a atividade das enzimas pecticas representam fator crítico⁽¹⁰⁾.

A inativação dessas enzimas é fundamental para prevenir a indesejável perda de turbidez e consistência, em sucos de laranja e produtos de tomate. A perda dessas características é atribuída à desesterificação da pectina, originando pectinas de baixa metoxilação.

TERMOTTE et al.⁽⁵⁸⁾ conseguiram estabilizar a turvação do suco de laranja, inibindo competitivamente a pectinesterase com hidrolisado de ácido pectico.

Segundo LINEWEAVER & JANSEN⁽³⁴⁾, a pectinesterase ataca as ligações metil-ésteres adjacentes e grupos carboxilas livres de poligalacturônides. Os ácidos pectínicos produzidos pela enzima, comportam-se como se ligações éster tivessem sido separadas de sucessivos sítios da molécula, o que não acontece com os ácidos pectínicos produzidos pela ação de álcali ou ácido^(15, 22,56,57).

KERTESZ⁽²³⁾ e LINEWEAVER & BALLOU⁽³¹⁾ verificaram que a enzima de tomate e alfafa não hidrolisam o metil-éster de α -metil-D-galacturônide. Portanto, o requisito estrutural para ação da pectinesterase, parece ser a porção ácida do éster constituído de um poligalacturônide. LINEWEAVER et al.⁽³⁵⁾ e MacDONNEL

et al.⁽³⁹⁾ concluíram ser a enzima, uma esterase altamente específica.

Quanto à localização do sítio de ação inicial da pectinesterase de tomates, LEE & MacMILLAN⁽³⁰⁾ concluíram que a enzima atua no grupamento redutor final da cadeia de pectina.

O reconhecimento da pectinesterase como "enzima de parede celular", permitiu o desenvolvimento de métodos eficientes de extração.

JANSEN et al.⁽²¹⁾ estudaram a pectinesterase da laranja "in situ", demonstrando que a mesma é inativa a pH abaixo de 4,5, mas que a enzima solúvel é ativa nestas condições. Desta maneira, os autores evidenciaram que a pectinesterase ligada à parede celular é inativa na faixa de pH fisiológico dos frutos cítricos.

A extração da pectinesterase depende da concentração salina e pH do meio extrator^(17,38), assim como a atividade da enzima depende da presença de cátions mono ou divalentes no meio de reação^(14,25,26,31,32,38,42,52).

O primeiro registro na literatura relativo ao efeito de cátions mono e divalentes na atividade da pectinesterase foi feito por KOPACZEWSKI⁽²⁷⁾, que verificou não ocorrer deesterificação na ausência de sais alcalinos terrosos, fato este posteriormente confirmado por LINEWEAVER & BALLOU⁽³²⁾.

O aumento de atividade determinado por cátions também depende do pH da reação; em contrapartida, o pH ótimo é influenciado pela concentração e tipo de cátions presentes. Este aumento pode ser ainda determinado por fatores fisiológicos, tais como maturação e amadurecimento de frutos^(25,52).

O método mais simples e de largo emprego pelos enzimologistas, para determinar a atividade de pectinesterase, consiste em medir a desesterificação a pH constante^(32,38,44). A determinação do metanol liberado é usada por alguns pesquisadores com a mesma finalidade^(17,52,61).

A purificação da pectinesterase tem sido feita com auxílio de métodos clássicos. MacDONNEL et al.⁽³⁹⁾, por exemplo, utilizaram uma combinação de fracionamento, adsorção e diálise.

A pectinesterase do tomate foi purificada por LEE & MacMILLAN⁽²⁹⁾ através de precipitação com sulfato de amônio, adsorção em gel de fosfato de cálcio e cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-75. NAKAGAWA et al.⁽⁴⁹⁾ obtiveram melhor resultado, empregando fracionamento, cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-100.

MANABE⁽⁴⁰⁾ purificou a pectinesterase de Citrus natsudaidai fracionando-a com sulfato de amônio, seguido de diálise, cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-100. Nestas condições, a atividade específica aumentou em 460 vezes.

HULTIN & LEVINE⁽¹⁸⁾ caracterizaram três formas de pectinesterase de banana. As formas isoladas diferiam quanto a resposta a cátions, fosfato inorgânico, sacarose e propriedades cinéticas⁽²⁰⁾.

PRESSEY & AVANTS⁽⁵⁹⁾ e EVANS & McHALE⁽¹³⁾ isolaram, respectivamente, formas múltiplas da pectinesterase de tomate, laranja e lima. Também MARKOVIC⁽⁴¹⁾ e DELINCEE⁽⁹⁾ encontraram formas moleculares distintas da enzima, na cenoura e no tomate.

Este fato foi verificado em vários frutos cítricos^(28, 60), apresentando as isoenzimas diferentes propriedades cinéticas,

notadamente com relação à atividade a baixos valores de pH, afinidade para a pectina e grau de inibição com poligalacturonato .

A pectinesterase não é facilmente inativada por agentes químicos, tais como cianeto, iodeto e formaldeído^(42,45).

KÖRNER et al.⁽²⁸⁾, estudando a pectinesterase da laranja, verificaram que os ácidos algínicos e galacturônicos não inibem a atividade enzimática.

PRESSEY & AVANTS⁽⁵³⁾ verificaram que o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), um efetivo inibidor da pectinesterase de tomates, atua de maneira diferente nas formas enzimáticas estudadas. Também o EDTA, atuando como agente quelante, inibe a atividade da pectinesterase.

Ao verificarem que a pectinesterase é inibida pela sacarose às mesmas concentrações que impedem a floculação do purê de mamão, CHANG et al.⁽⁶⁾ concluíram que este fenômeno era provocado pela atividade da enzima citada. Considerando-se que a floculação do purê diminui a eficiência do processamento, tem-se estudado os fatores inibitórios da pectinesterase como tratamento térmico, adição de sacarose e uso de ácido poligalacturônico.

2 - OBJETIVOS

Com base na literatura consultada e considerando-se a importância da pectinesterase no processo de amadurecimento, o presente trabalho tem por objetivo:

- 2.1 - Determinar a atividade da pectinesterase e substâncias pecticas no mamão, durante o armazenamento.
- 2.2 - Otimizar as condições de extração da pectinesterase.
- 2.3 - Purificar e caracterizar algumas das propriedades da enzima.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Amostras

Os mamões (Carica papaya L.) da variedade Solo, no estágio verde-maturo, foram obtidos junto à Fazenda Experimental do Instituto Agronômico de Campinas.

3.1.2 - Reagentes

3.1.2.1 - Reagentes para extração e purificação

Pectina cítrica, Triton X-100, ditioeritritol (DTE) e 2-mercaptoetanol foram adquiridos da Sigma Chemical Co.-USA; polivinilpirrolidona insolúvel (policlar AT) foi adquirido da Serva Fein-biochimica-Germany; sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, cloreto de sódio (NaCl), metabissulfito de sódio $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5)$ e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Carlo Erba; hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4) e fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4)

foram adquiridos da Merck, Darmstadt-Germany.

3.1.2.2 - Reagentes para determinação de substâncias pecticas

Pectinase e ácido D-galacturônico foram adquiridos da Sigma Chemical Co.-USA; carbazol foi adquirido da BDH-Chemicals Ltd-England; tetraborato de sódio decahidratado foi adquirido da Reagen, Ind. Brasileira; álcool etílico 95%, ácido acético glacial e ácido sulfúrico foram adquiridos da Carlo Erba.

3.1.2.3 - Resinas para purificação

Dietilaminoetil celulose (DEAE-celulose) e Sephadex G-100 foram adquiridas da Sigma Chemical Co.-USA.

3.1.2.4 - Reagentes para determinação de peso molecular e proteína

Blue dextrana 2.000, inibidor de tripsina de soja - Tipo L-S, albumina de soro bovino (BSA), citocromo-C de coração de cavalo e ovalbumina foram adquiridos da Sigma Chemical Co.-USA; fosfatase alcalina de intestino de boi foi adquirida da Boehringer Manhein-Germany; reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Merck, Darmstadt-Germany.

3.1.2.5 - Reagentes para eletroforese

N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED), azul de bromofenol, coomassie brilliant blue R e riboflavina foram adquiridos da Sigma Chemical Co.-USA; acrilamida e N-N-metilene-bisacrilamida, da BDH-Chemicals Ltd .-England.

3.1.2.6 - Inibidores

Ácido poligalacturônico foi adquirido da Nutritional Biochemicals Corporation; sacarose e d-glicose foram adquiridos da Merck, Darmstadt, Germany; EDTA e glicerol foram adquiridos da Carlo Erba; SDS foi adquirido da Sigma Chemical Co.-USA.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Preparo das amostras

As amostras, transportadas para o laboratório, foram armazenadas em câmaras com umidade controlada, à temperatura de 20°C. Para acompanhar as fases do amadurecimento, tomou-se como parâmetro as variações na coloração da casca dos frutos (Tabela 1).

TABELA 1 - Modificações de cor do mamão no amadurecimento

Tempo de armazenamento (dias)	Estágios de amadurecimento de acordo com a cor	Características
zero	verde-maturo	coloração totalmente verde
3	1/3 maduro	coloração verde predominando à amarela
6	2/3 maduro	coloração amarela predominando à verde
9	maduro	coloração amarela muito mais predominando à verde- (estágio de consumo)
15	muito maduro	coloração totalmente amarela (estágio senescente)

As amostras correspondentes a zero, 3, 6, 9 e 15 dias de armazenamento, após serem lavadas, descascadas, limpas das sementes e cortadas, foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -20°C , até o momento das análises.

3.2.2 - Extração da pectinesterase

A pectinesterase foi extraída, homogeneizando-se ali - quotas da amostra congelada, adicionada de solução de NaCl 0,6 M contendo 1 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a pH 8,5 na relação massa de polpa/volume - 1:5, em homogeneizador do tipo "Ultra-Turrax", por 1 minu-

to. O homogenato obtido foi centrifugado (1a. extração) a 15.000 rpm/40 minutos, a 4°C. O sedimento (resíduo) obtido foi re-extraído com solução de NaCl 0,6 M a pH 8,5, sob agitação contínua, por 1 hora em câmara fria (4°C). A suspensão resultante foi centrifugada (2a. extração) nas condições anteriormente descritas. A reunião dos sobrenadantes denominou-se "extrato bruto" e foi utilizado como fonte de enzima.

3.2.3 - Extração de substâncias pecticas

A extração e a determinação de pectina solúvel e total foram realizadas de acordo com o método de McCREADY & McCOMB⁽⁴⁵⁾.

3.2.4 - Determinação de atividade da pectinesterase

A atividade da pectinesterase foi determinada através da titulação contínua dos grupos carboxilas formados pela desesterificação da pectina pela enzima a pH 8,0, sob agitação constante, com solução de NaOH 0,02 N por 6 minutos (leitura a cada 2 minutos), de acordo com o método preconizado por KERTESZ⁽²⁶⁾. A mistura reacional era constituída de 30 ml de pectina cítrica 0,25%, NaCl em concentração de 0,2 M, alíquota da enzima e água destilada em volume final de 50 ml. O ensaio foi executado à temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

A atividade enzimática foi calculada com base no número de microequivalentes de NaOH consumidos na titulação e uma

unidade de pectinesterase, simbolizada por PE_U , representa um μ eq de éster hidrolisado/min. A atividade específica (AE) significa μ eq de éster hidrolisado/min/mg de proteína.

3.2.5 - Determinação de proteína

Foi realizada pelo método de LOWRY et al.⁽³⁸⁾, usando-se albumina de soro bovino (BSA) como referência. No eluato das colunas cromatográficas, utilizou-se a medida de absorção a 280 nm.

3.2.6 - Otimização das condições de extração da pectinesterase

3.2.6.1 - Efeito da relação massa/volume

A enzima foi extraída nas relações massa/volume 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5.

3.2.6.2 - Efeito da concentração de NaCl

Foram testadas as concentrações de 0,1 M a 1,5 M de NaCl.

3.2.6.3 - Efeito de agentes protetores

Foi verificada a ação de policlar AT, DTE, 2-mercaptoetanol e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

3.2.6.4 - Efeito do Triton X-100 na extração do sedimento (resíduo)

Triton X-100, nas concentrações de 0,5% e 1%, foi adicionado ao sedimento resultante da primeira extração, conforme descrito em 3.2.2.

3.2.7 - Purificação da pectinesterase

3.2.7.1 - Fracionamento com sulfato de amônio

O fracionamento foi realizado com a adição de sulfato de amônio sólido ao extrato, nas concentrações de 0-20, 20-40, 40-60, 60-70, 70-80 e 80-90% de saturação, sob agitação constante, em câmara fria (4°C). Durante o fracionamento, o pH foi mantido a 7,0 pela adição de solução de NaOH. Ao término de cada operação, o material permaneceu em agitação por 2 horas, após o que foi centrifugado a 14.000 rpm/30 minutos. Os precipitados assim obtidos, foram dissolvidos em tampão fosfato 5 mM - pH 7,5 e dialisados contra o mesmo tampão, por 2 horas, à temperatura de 4°C .

3.2.7.2 - Cromatografia em DEAE-celulose

O dialisado da etapa anterior foi aplicado em coluna de DEAE-celulose, de 21 x 1,5 cm, previamente equilibrada com tampão fosfato 5 mM-pH 7,5. A coluna foi lavada com o mesmo tampão para remover o excesso de proteína não adsorvida na resina. A enzima foi eluída com auxílio de gradiente linear de 0-0,4 M de NaCl, coletando-se automaticamente frações de 3 ml cada.

Os tubos cujos conteúdos apresentaram atividade enzimática considerável foram reunidos em "pool" e aplicados em coluna de Sephadex G-100.

3.2.7.3 - Cromatografia em Sephadex G-100

A coluna de Sephadex G-100 (41 x 2,5 cm) foi equilibrada com tampão fosfato 5 mM-pH 7,5. A enzima foi eluída com o mesmo tampão a um fluxo de 12 ml/hora, coletando-se automaticamente frações de 3 ml cada.

3.2.8 - Ensaios de caracterização de pectinesterase purificada

3.2.8.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

O procedimento eletroforético foi realizado segundo a técnica de DAVIS⁽⁸⁾.

3.2.8.2 - Determinação de peso molecular

O peso molecular da enzima foi determinado por cromatografia de exclusão molecular, em Sephadex G-100, através do método descrito por ANDREWS⁽²⁾, usando-se como referência: albumina de soro bovino, ovalbumina, inibidor de tripsina e citocromo-C.

3.2.8.3 - Influência do pH na atividade enzimática

A influência do pH na atividade da pectinesterase foi verificada através da medida de atividade a diferentes valores de pH.

3.2.8.4 - Efeito da concentração de NaCl na atividade enzimática

A atividade da enzima foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl no meio de reação.

3.2.8.5 - Efeito de íons mono e divalentes na atividade enzimática, em função do pH

Foram testados os efeitos de íons Na^+ e Ca^{++} a pH 6, 7 e 8.

3.2.8.6 - Determinação da temperatura ótima

A influência da temperatura de ensaio na atividade enzimática foi verificada na faixa de 20-70°C.

3.2.8.7 - Estabilidade térmica

Os ensaios de estabilidade térmica foram efetuados na faixa de 30-80°C, em períodos até 60 minutos.

3.2.8.8 - Influência do pH na estabilidade térmica

A enzima foi incubada em meios com diferentes valores de pH à temperatura de 70°C, variando-se o tempo de incubação.

3.2.8.9 - Influência de NaCl na estabilidade térmica

Verificou-se a influência de NaCl, na concentração de 0,2 M, na estabilidade da enzima a 70°C e a pH 7,5.

3.2.8.10 - Estabilidade ao congelamento

Frações da enzima purificada foram congeladas a -20°C e tiveram suas atividades determinadas em período de tempo de 10 a 40 dias.

3.2.8.11 - Linearidade de reação

A linearidade da reação foi determinada em função do tempo e concentração de proteína.

3.2.8.12 - Determinação de constante cinética

K_m e $V_{m\max}$ foram determinadas medindo-se a atividade enzimática a diferentes concentrações de substrato e os valores calculados pelo gráfico dos duplos-recíprocos de Lineweaver-Burck.

3.2.9 - Estudos de inibição

3.2.9.1 - Determinação de tipo e constante de inibição

O tipo de inibição e a K_i foram determinados, medindo-se a atividade enzimática a várias concentrações de inibidor, de acordo com o procedimento proposto por DIXON⁽¹¹⁾.

3.2.9.2. - Inibidores da pectinesterase

Foram testados sacarose, d-glicose, glicerol, SDS e EDTA.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Atividade enzimática e substâncias pecticas

Foram determinadas a atividade da pectinesterase e as concentrações de pectina solúvel e protopectina durante o amadurecimento do mamão armazenado a 20°C. Esta temperatura foi escolhida com base nos dados da literatura, que evidenciam uma faixa ótima de 15-20°C para o amadurecimento do fruto. Realmente, constatou-se durante o período de armazenamento, que os frutos mantinham-se em boas condições. Segundo os dados apresentados na Tabela 2 e Figura 1, a atividade da pectinesterase aumentou consideravelmente até o 39 dia de armazenamento. A partir deste momento até o 159 dia, houve um aumento gradativo na atividade. Fato semelhante foi verificado no tomate, por outros autores^(16, 26,52).

Da análise da Tabela 2, constata-se que houve aumento significativo quanto à proteína total extraída do mamão armazenado por 9 dias (estágio de consumo do fruto). Decorrente dessa alta concentração de proteína, houve um decréscimo na atividade específica (AE) da enzima, que aumentava desde o estágio verde-maturo até esta fase de amadurecimento, acompanhando a ativida

FIGURA 1 - Atividade da pectinesterase e concentração de pectina solúvel e protopectina no armazenamento.

- (—●—) atividade da pectinesterase
- (—○—) atividade específica (AE)
- (—▲—) pectina solúvel
- (—△—) protopectina

Tabela 2 - Atividade da pectinesterase e concentração de pectinas do mamão no armazenamento

Tempo de armazenamento (dias)	PE _U /g fruto	mg proteína/ / g fruto	AE	Pectina solúvel (mg/g fruto)	Protopectina (mg/g fruto)
zero	5,61	0,49	11,32	0,18	6,50
3	10,05	0,70	14,26	0,83	4,92
6	12,48	0,70	17,70	1,95	3,90
9	13,25	1,02	12,97	2,00	3,75
15	14,97	0,99	15,19	3,35	2,25

PE_U = unidades de atividade da pectinesterase

AE = atividade específica (unidades de atividade/mg de proteína)

de total da pectinesterase (PE_U) (Figura 1).

A concentração de pectina solúvel aumentou a partir do "tempo zero" até o 6º dia de armazenamento, mantendo-se constante entre o 6º e o 9º dia, experimentando novo aumento até o 15º dia. O teor de pectina solúvel praticamente acompanhou a atividade de pectinesterase, ambos relacionados com o processo de amadurecimento de frutos. Concomitantemente, a concentração de protopectina sofreu declínio durante o armazenamento. O mesmo comportamento foi verificado em pêssego, maçã e pêra, estudados, respectivamente, por PRESSEY et al.⁽⁵⁴⁾, WOODMANSE⁽⁶²⁾ e BEN-ARIE et al.⁽⁴⁾.

AL-JASIM & AL-DELAIFY⁽¹⁾, BARNES & PATCHET⁽³⁾ e HULTIN & LEVINE⁽¹⁹⁾, trabalhando respectivamente com tâmaras, mo-

rangos e bananas, obtiveram aumento de atividade da pectinesterase no amadurecimento. Por outro lado, PALMER⁽⁵¹⁾ encontrou na banana, atividade constante da enzima durante aquele período, sendo posteriormente confirmado por BRADY⁽⁵⁾.

4.2 - Otimização das condições de extração da pectinesterase

4.2.1 - Relação massa/volume

Foi testada a eficiência na extração da pectinesterase, trabalhando-se com concentração fixa de polpa a vários volumes de solução de NaCl, obedecendo as relações 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5.

Tabela 3 - Relação massa/volume para extração da pectinesterase

Relação massa/volume	PE _U	Proteína (mg)	AE
1:1,5	70,17	10,78	6,51
1:2	80,92	10,42	7,76
1:3	72,86	10,37	7,02
1:4	107,17	10,16	10,54
1:5	112,15	9,91	11,32

Na Tabela 3, pode ser observado que se a quantidade de proteína extraída não apresentou variação significativa, houve diferenças expressivas na atividade enzimática, atingindo um mǎ-

ximo na relação 1:5 (Tabela 3). Esta relação 1:5 mostrou-se eficiente na solubilização de maior quantidade de enzima.

4.2.2 - Efeito da concentração de NaCl

A pectinesterase é considerada "enzima de parede celular" (26). Assim, sua extração depende da força iônica do meio extrator a ser utilizado. Neste experimento, verificou-se a influência da solução de NaCl a diferentes molaridades, como sistema extrator.

Do exame da Tabela 4 e Figura 2, observa-se aumento significativo da atividade enzimática até a concentração de 0,8 M. Após esta molaridade, a atividade mostrou-se praticamente constante, apresentando, porém, um máximo a 1,2 M (Figura 2).

Tabela 4 - Efeito da concentração de NaCl na extração da pectinesterase.

Concentração Molar de NaCl	PE _U	Proteína (mg)	AE
0,1	49,28	9,86	5,00
0,15	61,04	7,96	7,67
0,2	72,08	7,74	9,31
0,3	126,48	9,69	13,05
0,4	153,92	9,67	15,92
0,6	167,04	8,70	19,20
0,8	179,36	8,61	20,83
1,0	180,96	7,89	22,83
1,2	183,68	9,52	19,29
1,5	182,40	10,37	17,59

FIGURA 2 - Efeito da concentração de NaCl na extração da PE.

Apesar dos resultados obtidos, escolheu-se a concentração 0,6 M para as extrações, onde era menor a quantidade de pectina solubilizada.

4.2.3 - Efeito de agentes protetores

Em vista da informação de que os compostos fenólicos presentes em tecidos vegetais reagem com proteínas interferindo na extração das enzimas^(36,47) e da labilidade dos grupos sulfidrilas dos aminoácidos que exerçam alguma função na catálise, verificou-se o efeito de agentes como policlar AT, DTE, 2-mercaptoetanol e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, na extração da pectinesterase. Neste ensaio, utilizaram-se 10g da amostra.

Os resultados registrados na Tabela 5, mostram que apenas o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ contribuiu no sentido de aumentar a atividade enzimática, demonstrando eficiência na extração. Este fato pode estar relacionado à baixa concentração de compostos fenólicos no mamão, tornando sem efeito a ação dos adsorventes e inibidores da polifenoloxidase utilizados.

4.2.4 - Efeito do Triton X-100 na extração do sedimento (resíduo)

Os detergentes aniônicos possuem a capacidade de romper os tecidos, solubilizando enzimas da parede vegetal. Neste

Tabela 5 - Efeito de agentes protetores na extração de pectinesterase

Agentes protetores	PE _U	Proteína (mg)	AE
Controle	93,06	7,05	13,20
Policlar AT (0,1 g)	90,46	7,97	11,35
Policlar AT (0,2 g)	92,61	8,63	10,73
Policlar AT (0,4 g)	99,56	8,30	11,99
Policlar AT (0,6 g)	93,67	8,73	10,73
Policlar AT (0,8 g)	101,66	7,94	12,81
Policlar AT (1,0 g)	100,78	8,65	11,65
DTE (2 mM)	110,53	5,41	20,44
2-mercaptoetanol (5 mM)	101,04	5,83	17,35
Na ₂ S ₂ O ₅ (1 mM)	113,77	7,64	14,89

DTE = ditioeritritol

Policlar AT = polivinilpirrolidona insolúvel

sentido, empregou-se o Triton X-100 na extração do sedimento da 1ª. centrifugação para medir a sua eficiência quanto à solubilização da enzima. Entretanto, pode-se constatar pelos dados da Tabela 6, que o uso do Triton X-100 nas concentrações 0,5% e 1%, não apresentou resultados positivos.

Tabela 6 - Efeito do Triton X-100 na extração do sedimento

Extratos enzimáticos	PE _U		
	Controle	Triton X-100	
		0,5%	1,0%
EB ₁	126,82	126,0	128,25
EB ₂	36,80	42,5	39,95
EB ₁ + EB ₂	163,62	168,5	168,20

EB₁ = sobrenadante obtido da 1a. centrifugação

EB₂ = sobrenadante obtido da 2a. centrifugação

4.3 - Purificação da pectinesterase

4.3.1 - Fracionamento com sulfato de amônio

Nas extrações realizadas para a purificação da pectinesterase, utilizaram-se 80g de polpa do mamão armazenado durante 9 dias. Como os extratos enzimáticos apresentassem grandes quantidades de pectina, esta era separada por centrifugação, após 1 h de repouso sob refrigeração.

A concentração da proteína presente no extrato bruto foi realizada por meio da precipitação fracionada com sulfato de amônio a 0-20, 20-40, 40-60, 60-70, 70-80 e 80-90% de saturação, como descrito em 3.2.7.1.

Na Tabela 7, onde estão registrados os resultados obtidos do fracionamento, pode-se observar que até 60% de saturação, houve apenas 11,62% de recuperação da atividade enzimática, com remoção de pectina e pigmentos.

Tabela 7 - Fracionamento da pectinesterase com sulfato de amônio

Frações	PE _U	Recuperação da atividade enzimática (%)	Proteína (mg)	AE
Extrato bruto	1.289,80	100	20,66	62,41
0-20%	60	4,65	1	60
20-40%	46,80	3,62	1,39	33,81
40-60%	43,20	3,35	3,51	12,31
60-70%	69,66	7,08	2,20	31,66
70-80%	161	16,37	3,15	51,11
80-90%	261	26,54	3,1	84,06

Nas frações de 60 a 90% foi obtido cerca de 50% de recuperação da atividade (Tabela 7), constituindo a fração de escolha para o processo de concentração e purificação da enzima. Para este fim, o precipitado obtido na faixa de 60-90% após dissolvido em tampão fosfato 5 mM-pH 7,5, foi dialisado por 15 horas contra o mesmo tampão.

Pelos dados da Tabela 8, esta etapa mostrou-se eficiente no processo de purificação, conferindo um fator de 2,74 para o mesmo, removendo 35,23% da proteína original.

Tabela 8 - Purificação da pectinesterase do mamão

Procedimento	Volume total (mg)	PE _U	Proteína (mg)	AE	Fator de purificação
Extrato bruto	205	615	77,9	7,89	1
Dialisado (pós-fracionamento)	18	594	27,45	21,64	2,74
DEAE-celulose (pico)	3	27	0,96	28,12	3,57
Sephadex G-100 (pico)	3	17,25	0,49	35,38	4,48

4.3.2 - Cromatografia em DEAE-celulose

O dialisado obtido em 3.3.1 foi aplicado em coluna de DEAE-celulose de 21 x 1,5 cm previamente equilibrada com tampão fosfato 5 mM-pH 7,5 e eluido somente com este tampão até remoção de proteínas não adsorvidas na coluna, a qual não apresentou atividade enzimática. A eluição da enzima foi realizada utilizando-se gradiente linear de 0-0,4 M de NaCl que totalizou 300 ml, coletando-se frações de 3 ml (Figura 3). Da fração com atividade máxima (pico) correspondente a 0,076 M de NaCl, tomou-se alíquota para determinação de proteína.

Segundo os resultados inseridos na Tabela 8, foi obtido aumento de atividade específica por um fator de 3,57, correspondente a 4,39% da atividade original. A quantidade de proteína retida foi de 1,23% da concentração protéica inicial (Tabela

FIGURA 3 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato 5 mM pH 7,5. A enzima foi eluída com gradiente linear de 0-0,4M de NaCl aplicada a partir do tubo 41. Foram coletadas frações de 3,0 ml cada.

(—●—) atividade enzimática
 (-----) proteína

8). Esta etapa foi eficiente na remoção de proteínas inertes.

Nesta fase de estudo conseguiu-se adsorver a pectinesterase do mamão à resina de DEAE-celulose, sendo observado que na adsorção da mesma, a força iônica do tampão representa um fator crítico.

O perfil de distribuição da atividade registrado na Figura 3, revela a presença de apenas uma forma ativa, descartando a possibilidade da presença de formas múltiplas da enzima em estudo, neste estágio de purificação.

MANABE⁽⁴⁰⁾, NAKAGAWA et al.⁽⁴⁹⁾ e LEE & MacMILLAN⁽²⁹⁾ encontraram, respectivamente, em Citrus natsudaïdai e tomates, apenas uma forma molecular da pectinesterase.

A acentuada perda de atividade observada foi limitante no processo de purificação; na tentativa de resolver o problema, valeu-se do auxílio de alguns agentes protetores: 2-mercaptoetanol, ditioeritritol e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Os resultados foram insatisfatórios.

4.3.3 - Cromatografia em Sephadex G-100

As frações do eluato da etapa anterior foram reunidas e aplicadas em coluna de Sephadex G-100 (41 x 2,5 cm), equilibrada com tampão fosfato 5 mM-pH 7,5.

A Figura 4 mostra o perfil de eluição da pectinesterase em apenas uma forma molecular.

Pelos dados da Tabela 8, verifica-se que foi obtido

FIGURA 4 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato 5 mM pH 7,5. A enzima foi eluída com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3,0ml cada.

(—) atividade enzimática

(-----) proteína

aumento na atividade específica de 4,48 vezes, onde o pico de atividade reteve 2,8% da atividade original. A perda de atividade foi relativamente grande. Por outro lado, a remoção de proteínas que não a pectinesterase foi significativa, encontrando-se no pico apenas 0,63% da proteína do extrato inicial.

NAKAGAWA et al.⁽⁴⁹⁾ conseguiram purificar a pectinesterase do tomate por um fator de 60, utilizando fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-100. Por sua vez, BRADY⁽⁵⁾, através do fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose, focalização isoeletrica e cromatografia em Sephadex G-200, obteve um fator de 200 para a enzima da banana.

4.4 - Ensaios de caracterização da pectinesterase purificada

4.4.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

A enzima purificada de acordo com os procedimentos descritos, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida com o intuito de avaliar o grau de purificação obtido.

Na Figura 5 apresentou-se o perfil eletroforético das etapas de purificação: fracionamento com sulfato de amônio e diálise, cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-100.

Analizando a Figura 5, verifica-se a presença de duas bandas de proteínas no material eluído da coluna de DEAE-celulose e Sephadex G-100, revelando a eficiência do processo de purificação empregado.

FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Extrato bruto - proteína 32 μ g

Dialisado (pós-fracionamento) - proteína 98 μ g

DEAE - celulose (pico) - proteína 22 μ g

Sephadex G-100 (pico) - proteína 18 μ g

MILLER & MacMILLAN⁽⁴⁶⁾, também detectaram duas bandas eletroforéticas na preparação da pectinesterase de Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum purificada através do procedimento: cromatografia em DEAE-Sephadex, Sephadex G-75, CM-Sephadex e CM-celulose. Apesar disso, os autores colocam em dúvida se uma das bandas representaria uma proteína contaminante ou se as duas consistiriam em isoenzimas da pectinesterase. A realização de uma reação específica para localizar a enzima no gel viria esclarecer quanto a esta última possibilidade.

4.4.2 - Determinação de peso molecular

A determinação do peso molecular da pectinesterase foi realizada por cromatografia de exclusão molecular, em coluna de Sephadex G-100, preparada como anteriormente descrito. Os padrões utilizados para a calibração da coluna foram: citrocromoc (PM 12.000), inibidor de tripsina de soja (PM 21.500), ovalbumina (PM 45.000), albumina de soro bovino (PM 67.000) e fosfatase alcalina (PM 100.000). A determinação de volume vazio ($V_0 = 78$ ml) da coluna foi realizada com auxílio de blue dextrana 2.000.

O log do peso molecular contra a relação V_e/V_0 permitiu estimar um peso molecular de 53.000 daltons para a pectinesterase do mamão (Figura 6).

BRADY⁽⁵⁾ e MARKOVIC⁽⁴¹⁾, determinaram, respectivamente, um peso molecular de cerca de 30.000 para a enzima da banana e 27.000 para a da cenoura.

FIGURA 6 - Determinação de peso molecular por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. Calibração da coluna realizada de acordo com o método 3.2.82.

4.4.3 - Influência do pH na atividade enzimática

A influência do pH na atividade da pectinesterase foi verificada, realizando-se paralelamente, reações sem a adição de enzima (prova em branco) para avaliar a desesterificação da pectina em meios ácido e alcalino.

Na Figura 7, tem-se representada a curva de pH contra atividade enzimática, onde se registrou somente a desesterificação promovida pela enzima. A enzima apresenta apenas um ótimo a pH 8,0.

Segundo os resultados obtidos por LEE & MacMILLAN⁽²⁹⁾, a pectinase de tomate apresenta atividade máxima na região de pH entre 6,0 e 9,0. Trabalhando com o mesmo material, NAKAGAWA et al.⁽⁵⁰⁾ encontraram um pH ótimo na faixa de 8,0 a 8,5.

MANABE⁽⁴⁰⁾ evidenciou na pectinesterase de Citrus natsudaikai, um ótimo a pH 8,0. JANSEN et al.⁽²¹⁾ encontraram atividade máxima na enzima da laranja a pH 7,5.

O pH ótimo da enzima da cenoura e da vagem está situado, segundo MARKOVIC⁽⁴¹⁾ e VAN BUREN et al.⁽⁵⁹⁾, respectivamente, entre 7,8 e 8,0 e a 8,2.

FIGURA 7 - Influência do pH na atividade da pectinesterase.

4.4.4 - Efeito da concentração de NaCl na atividade enzimática

A influência de diferentes concentrações de NaCl na atividade da pectinesterase, pode ser observada na Figura 8.

A atividade máxima foi obtida à concentração de 0,2 M de NaCl. Vale ressaltar que a partir desta concentração, o íon Na^+ passou a exercer efeito inibitório na atividade enzimática. Resultados semelhantes foram encontrados por MARKOVIC⁽⁴¹⁾ com a enzima de cenoura. Para a pectinesterase de ervilhas estudada por COLLINS⁽⁷⁾, a concentração salina ótima é 0,25 M.

4.4.5 - Efeito de íons mono e divalentes na atividade enzimática em função do pH

A análise da Figura 9A revela que o pH influenciou na concentração de NaCl necessária para atingir a atividade máxima. Na faixa de pH alcalino, pode-se verificar que a concentração de NaCl no máximo de atividade foi semelhante a pH 7,0 e 8,0. A atividade enzimática foi maior a pH 8,0, independente da concentração de íons.

Em relação ao CaCl_2 , a atividade máxima foi atingida à concentração 10 vezes menor (Figura 9B) que a de NaCl. Em todos os pH ensaiados, necessitou-se de 0,02 M de CaCl_2 .

Segundo LEE & MacMILLAN⁽²⁹⁾, a concentração de CaCl_2 e

FIGURA 8 - Efeito da concentração de NaCl na atividade da pecti_nesterase .

FIGURA 9 - Efeito de íons: (A) NaCl e (B) CaCl₂ na atividade da pectinesterase em função do pH.

(—▲—) pH = 6
 (—○—) pH = 7
 (—●—) pH = 8

NaCl requerida pela enzima de tomate $\bar{e}$, respectivamente, de 0,005 M e 0,05 M. Por sua vez, NAKAGAWA et al.⁽⁵⁰⁾ encontraram os valores de 0,1 M e 0,005 M para NaCl e $MgCl_2$, respectivamente.

4.4.6 - Determinação da temperatura ótima

A pectinesterase ensaiada às temperaturas de 20 a 70°C apresentou atividade máxima a 60°C, sendo completamente inativa a 70°C (Figura 10). Executou-se paralelamente, a cada temperatura de ensaio, reações sem a adição de enzima (prova em branco), para determinar a intensidade da desesterificação térmica. Na Figura 10 registrou-se somente a desesterificação enzimática.

Trabalhando com tomates, PITHAWALA et al.⁽⁵²⁾ encontraram para a pectinesterase, uma temperatura ótima de 50°C. O mesmo valor foi encontrado por COLLINS⁽⁷⁾ que trabalhou com ervilhas. PURI et al.⁽⁵⁵⁾, estudando a enzima da batata e KÖRNER et al.⁽²⁹⁾ a da laranja, determinaram a temperatura ótima, respectivamente, a 55°C e 60°C.

4.4.7 - Estabilidade térmica

A temperatura de 30°C, a atividade da pectinesterase manteve-se estável por 60 minutos, à exceção de pequena diminuição de atividade no primeiro minuto (Figura 11). A 40 e 50°C, após o leve declínio inicial, a atividade permaneceu inalterada por

FIGURA 10 - Efeito de diferentes temperaturas na atividade da pectinesterase.

FIGURA 11 - Estabilidade térmica da pectinesterase. A enzima foi incubada por períodos até 60 minutos a temperaturas de 30°, 40°, 50°, 60°, 65°, 70° e 80°C.

20 minutos, decrescendo gradativamente ao longo do tempo de incubação. Após 10 minutos a 60°C, a enzima reteve 76,9% de sua atividade original, tendo sido completamente inativada a 65°C depois de 60 minutos. A 70°C, a inativação ocorreu em 9 minutos de incubação, tempo este reduzido para 1 minuto quando submetida a 80°C.

A enzima do tomate estudada por PITHAWALA et al.⁽⁵²⁾ sofreu 97,7% de inativação em 30 segundos a 80°C, temperatura na qual a pectinesterase de Citrus natsudaidai, objeto de estudo de MANABE⁽⁵⁰⁾, foi totalmente inativada. MARKOVIC⁽⁴¹⁾ e NAKAGAWA et al.⁽⁵⁴⁾ inativaram a 70°C, a enzima da cenoura e tomate, respectivamente.

4.4.8 - Influência do pH na estabilidade térmica

Neste ensaio foi verificado o efeito do pH na inativação da pectinesterase a 70°C.

A Figura 12 representa a percentagem de atividade residual em relação ao tempo de incubação. As atividades a pH 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5 corresponderam respectivamente, a 61,54%, 46,15%, 30,77% e 30,77% da atividade inicial, após 2 minutos de incubação (Figura 12).

Vale ressaltar que a pH 5,5, a enzima reteve 19,23% de sua atividade que chegou a zero aos pH 7,5 e 8,5, decorridos os 9 minutos de incubação. Os dados ora apresentados indicam que o pH ácido parece exercer efeito protetor quanto à inativação térmica. Apesar disso, VAN BUREN et al.⁽⁵⁹⁾ verificaram ser a pectinesterase de feijão, menos estável a pH ácido.

FIGURA 12 - Influência do pH na estabilidade térmica da pectineterase submetida a 70°C.

(—●—) pH = 5,5

(—○—) pH = 6,5

(—▲—) pH = 7,5 = 8,5

4.4.9 - Influência de NaCl na estabilidade térmica

A ativação da enzima pelo NaCl, à concentração de 0,2 M, conforme a Figura 8, levou a analisar sua influência na estabilidade térmica. Para tanto, ensaiou-se a enzima à 70°C na presença de 0,2 M de NaCl (Figura 13).

Analizando a Figura 13, pode-se verificar que até 4 minutos de incubação, o NaCl adicionado exerceu alguma proteção contra a inativação térmica, constituindo melhor exemplo, a incubação por 1 minuto, onde a enzima reteve 20% de sua atividade em relação ao controle.

4.4.10 - Estabilidade ao congelamento

O extrato enzimático armazenado à temperatura de -20°C mostrou, após 10 dias, perda de 13% de atividade. Após 40 dias, o extrato ainda mantinha 58% da atividade original.

Estes resultados, registrados na Tabela 9, indicam a possibilidade da conservação do extrato à temperatura de congelamento, por um tempo relativamente longo.

FIGURA 13 - Influência de NaCl na estabilidade térmica da pectinesterase submetida a 70°C.

(—●—) controle

(—○—) com NaCl

Tabela 9 - Estabilidade da pectinesterase ao congelamento

Tempo de armazenamento (dias)	PE _U	Perda de atividade (%)
0	132,51	0
10	115,2	13,06
20	96	27,55
35	92,16	30,45
40	76,8	42,04

4.4.11 - Linearidade de reação

Para verificar a linearidade da reação enzimática, representou-se graficamente cada miliequivalente de éster hidrolisado em função do tempo (Figura 14). A velocidade de reação foi acompanhada durante 90 minutos, observando-se aumento de mesma ordem a cada intervalo de tempo. PITHAWALA et al.⁽⁵²⁾ e NAKAGAWA et al.⁽⁵⁰⁾ também verificaram ser a atividade da enzima de tomate, linear com o tempo.

Do extrato enzimático purificado, contendo 158,75µg de proteína/ml, foram tomadas alíquotas e realizados ensaios para verificar a linearidade de reação frente à concentração de proteína. Na Figura 15, verifica-se que concentrações de proteína variando de 7,94 a 158,75 µg hidrolisaram a pectina a uma velocidade de de 0,13 µeq/min a 5,83 µeq/min , respectivamente.

FIGURA 14 - Velocidade de reação catalisada pela pectinesterase no decorrer de 90 min.

FIGURA 15 - Efeito da concentração de proteína sobre a atividade da pectinesterase.

A atividade aumentou linearmente com a concentração de proteína, o mesmo ocorrendo com a enzima de tomate estudada por PITHAWALA et al.⁽⁵²⁾ e NAKAGAWA et al.⁽⁵⁰⁾.

4.4.12 - Determinação de constante cinética

As determinações de K_m e $V_{m\max}$ da pectinesterase foram realizadas medindo-se a atividade enzimática a diferentes concentrações de substrato (pectina cítrica em g/l). Os valores foram calculados de acordo com o método dos duplos recíprocos, propostos por Lineweaver-Burk e inseridos na Figura 16.

Os valores de K_m e $V_{m\max}$ determinados foram respectivamente 0,12 g/l (= 0,012%) e 34,72 μ eq de éster hidrolisado/min/mg de proteína.

A curva obtida na Figura 17 mostra que a pectinesterase do mamão exibe cinética do tipo clássico Michaelis-Menten.

O valor determinado por CHANG et al.⁽⁶⁾ para a K_m da pectinesterase do mamão foi 0,03% de pectina N.F. NAKAGAWA et al.⁽⁴⁹⁾ encontraram um valor de 0,24% para a pectinesterase de tomate, usando pectina cítrica como substrato. Para a pectinesterase de Citrus natsudaïdai, a K_m observada por MANABE⁽⁴⁰⁾ foi 2,3 g/l. KÖRNER et al.⁽²⁸⁾ verificaram para a pectinesterase da laranja, valores de K_m 0,029% e 0,031%, enquanto MacDONNEL et al.⁽³⁸⁾ determinaram um valor de 0,08%. A K_m da enzima da batata estudada por PURI et al.⁽⁵⁵⁾ foi de 0,09%.

FIGURA 16 - Método gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da constante de Michaelis-Menten.

FIGURA 17 - Representação gráfica de acordo com o modelo proposto por Michaelis-Menten, para determinação da constante de inibição enzima-substrato (K_m).

4.5 - Estudo de inibição

4.5.1 - Determinação de tipo e constante de inibição

A possibilidade de regulação da atividade da pectinesterase foi verificada com auxílio de alguns inibidores.

O ácido poligalacturônico, produto de reação, é inibidor do tipo competitivo, segundo mostra a Figura 18. Esta propriedade indica que o referido ácido pode atuar no sentido de modular a atividade enzimática "in vivo", através de mecanismos de retroalimentação.

A determinação da constante de inibição (K_i) foi realizada com auxílio do método de DIXON⁽¹¹⁾. Fixou-se três concentrações de substrato: 0,1%, 0,25% e 0,5% e determinou-se a atividade enzimática, variando a concentração de ácido poligalacturônico (Figura 18).

O valor calculado para a constante de inibição (K_i) foi de 0,007%. De maneira semelhante, a pectinesterase do tomate é inibida competitivamente pelo ácido poligalacturônico, apresentando um K_i da ordem de $7 \times 10^{-3} \text{ M}$ ⁽²⁹⁾.

4.5.2 - Inibidores da pectinesterase

Em adição ao efeito do ácido poligalacturônico na atividade enzimática, analisou-se a influência da sacarose, d-glicose, glicerol, SDS e EDTA. De acordo com os resultados alcança-

FIGURA 18 - Determinação gráfica do tipo de inibição e da constante de inibição pelo método de DIXON⁽¹¹⁾.

- (●) $s_1 = 0,1\%$
 (○) $s_2 = 0,25\%$
 (▲) $s_3 = 0,5\%$

dos e dispostos na Tabela 10, o SDS constitui-se num potente inibidor da atividade enzimática, apresentando uma inibição de 89,29% à concentração de 4.10^{-4} M. Nesta concentração, o EDTA inibiu 21,43% da atividade da pectinesterase.

Tabela 10 - Influência de SDS e EDTA na atividade enzimática

Inibidores	Concentração molar dos inibidores	PE _U	% de inibição
Controle	—	287	—
SDS	4.10^{-5}	235,75	17,86
	4.10^{-4}	30,75	89,29
EDTA	4.10^{-4}	225,5	21,43
	4.10^{-3}	82	71,43

SDS = dodecil sulfato de sódio

EDTA = etileno diamino tetracetato de sódio

A sacarose e d-glicose, a um nível de 20%, inibiram a atividade da enzima em 39,29% e 32,14%, respectivamente, enquanto o glicerol, à mesma concentração, promoveu uma inibição de 53,57% conforme os resultados da Figura 19.

CHANG et al.⁽⁶⁾ verificaram inibição de tipo não-competitivo da pectinesterase do mamão pela sacarose, glicose e glicerol.

A inibição pelo ácido poligalacturônico, sacarose e glicose reveste-se de importância, considerando-se que os inibidores fazem parte da composição do fruto. Entretanto, o signifi

FIGURA 19 - Efeito de inibidores na atividade da pectinesterase.

(—●—) sacarose

(—○—) glicerol

(—▲—) glicose

cado fisiológico da inibição somente poderá ser inferido pelo confronto dos valores de K_i com a concentração dos inibidores no tecido.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 5.1 - A atividade da pectinesterase e a concentração de pectina solúvel aumentam no amadurecimento.
- 5.2 - A pectinesterase do mamão não apresenta formas moleculares múltiplas.
- 5.3 - O peso molecular da pectinesterase é 53.000 daltons.
- 5.4 - A pectinesterase do mamão apresenta atividade máxima a pH 8,0 e 0,2 M de NaCl. A temperatura ótima de ensaio é 60°C.
- 5.5 - A reação é linear com o tempo e concentração de proteína.
- 5.6 - O ácido poligalacturônico é inibidor da pectinesterase, apresentando inibição do tipo competitivo.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^(*)

- 1 - AL-JASIM, H.A. & AL-DELAIFY, K.S. Pectinesterase activity of some Iraqui dates at different stages of maturity. J.Sci. Food Agr., London, 23(7):915-7, 1972.
- 2 - ANDREWS, P. Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J., London, 91:222-33, 1964.
- 3 - BARNES, M.F. & PATCHET, B.J. Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. J. Food Sci., Chicago, 41(6):1392-5, 1976.
- 4 - BEN-ARIE, R. & SONEGO, L. Changes in pectic substances in ripening pears. J. Amer. Soc. Hortic. Sci., St. Joseph, 104(4):500-5, 1979.
- 5 - BRADY, C.J. The pectinesterase of the pulp of the banana fruit. Aust. J.Plant Physiol., Melbourne, 3:163-72, 1976.
- 6 - CHANG, L.W.S. et al. Papaya pectinesterase inhibition by sucrose. J. Food Sci., Chicago, 30:218-22, 1965.

(*) De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos estão de acordo com o World Medical Periodicals. 3rd. ed. New York, 1961.

- 7 - COLLINS, J.M. Pectin methyl esterase activity in Southern peas (Vigna sinensis). J. Food Sci., Chicago, 35(1): 1-4, 1971.
- 8 - DAVIS, B.J. Disceletrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 121:404-27, 1964.
- 9 - DELINCÉE, H. Thin-layer isoelectric focusing of multiple forms of tomato pectinesterase. Phytochemistry, Oxford, 15(6):903-6, 1976.
- 10 - DELINCÉE, H. & RADOLA, S.J. Size and charge properties of tomato pectin methylesterase. Biochim. biophys. Acta, Amsterdam, 214(1):178-89, 1970.
- 11 - DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J., London, 55:170-1, 1953.
- 12 - DRAETTA, I.S. et al. Biochemical changes in papaya (Carica papaya) during maturation. Colet. Inst. Tecnol. Alim., Campinas, 6(2):395-408, 1975.
- 13 - EVANS, R. & McHALE, D. Multiple forms of pectinesterase in limes and oranges. Phytochemistry, Oxford, 17(7):1073-5, 1978.
- 14 - HILLS, C.H. & MOTTERN, H.H. Properties of tomato pectase. J. biol. Chem., Baltimore, 168:651-63, 1947.
- 15 - HILLS, C.H. et al. Enzyme-demethylated pectinases and their gelation. Food Technol., Chicago, 3:90-4, 1949.
- 16 - HOBSON, G.E. Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit. Biochem. J., London, 86:358-65, 1963.

- 17 - HOLDEN, M. Studies on pectase. Biochem. J., London, 40: 103-8, 1946.
- 18 - HULTIN, H.O. & LEVINE, A.S. On the occurrence of multiple molecular forms of pectinesterase. Arch. Biochem. Biophys., New York, 101:396-402, 1963.
- 19 - HULTIN, H.O. & LEVINE, A.S. Pectin methyl esterase in the ripening banana. J. Food Sci., Chicago, 30:917-21, 1965.
- 20 - HULTIN, H.O. et al. Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. J. Food Sci., Chicago, 31:320-7, 1966.
- 21 - JANSEN, E.F. et al. Orange pectinesterase binding and activity. Food Res., Chicago, 25:64-72, 1960.
- 22 - JANSEN, E.F. & MacDONNELL, L.R. Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase. Arch. Biochem., New York, 8:97-112, 1945.
- 23 - KERTESZ, Z.I. Pectic enzymes. I. The determination of pectin-methoxylase activity. J. biol. Chem., Baltimore, 121:589-98, 1937.
- 24 - KERTESZ, Z.I. The pectic substances. New York, Interscience, 1951. 628 p.
- 25 - KERTESZ, Z.I. Pectic enzymes. II. Pectic enzymes of tomatoes. Food Res., Champaign, 3:481-7, 1938.
- 26 - KERTESZ, Z.I. Pectic enzymes. Meth. Enzymol., New York, 1:158-62, 1955.

- 27 - KOPACZEWSKI, M.W. Sur la coagulation de la pectine. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 7:419-28, 1925.
- 28 - KÖRNER, B. et al. Orange pectinesterase: purification, properties, and effect on cloud stability. J. Food Sci., Chicago , 45(5):1203-6, 1980.
- 29 - LEE, M. & MacMILLAN, J.D. Mode of action of pectic enzymes. I. Purification and certain properties of tomato pectinesterase. Biochemistry, Washington, 7(11):4005-10, 1968.
- 30 - LEE, M. & MacMILLAN, J.D. Mode of action of pectic enzymes. III. Site of initial action of tomato pectinesterase on high esterified pectin. Biochemistry, Washington, 9(9):1930-4, 1970.
- 31 - LINEWEAVER, H. & BALLOU, G.A. Properties of alfalfa pectinesterase (pectase). Federation Proc., Washington, 2:66, 1943.
- 32 - LINEWEAVER, H. & BALLOU, G.A. The effect of cations on the activity of alfalfa pectinesterase (pectase). Arch. Biochem., New York, 6:373-87, 1945.
- 33 - LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. chem. Soc., Washington , 56:658-66, 1934.
- 34 - LINEWEAVER, H. & JANSEN, E.F. Pectic enzymes. Advanc. Enzymol., New York, 11:267-93, 1951.
- 35 - LINEWEAVER, H. et al. Specificity of pectinesterase on higher plants. Federation Proc., Washington, 5:423-38, 1946.
- 36 - LOOMIS, W.D. & BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry, Oxford, 5:423-38, 1966.

- 37 - LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem., Baltimore, 193:265-75, 1951.
- 38 - MacDONNEL, L.R. et al. The properties of orange pectinesterase. Arch. Biochem., New York, 6:389-401, 1945.
- 39 - MacDONNELL, L.R. et al. Specificity of pectinesterases from several sources with some notes on purification of orange pectinesterases. Arch. Biochem., New York, 28: 260-273, 1950.
- 40 - MANABE, M. Purification and properties of Citrus natsudai-dai pectinesterase. Agric. biol. Chem., Tokyo, 37(6): 1487-91, 1973.
- 41 - MARKOVIC, D. Pectinesterase from carrot (Daucus carota, L.). Experientia, Basel, 34(5):561-2, 1978.
- 42 - McCOLLOCH, R.J. & KERTESZ, Z.I. Pectic enzymes. VIII. A comparison of fungal pectin-methyl-esterase with that of higher plants, especially tomatoes. Arch. Biochem., New York, 13:217-29, 1947.
- 43 - McCOLLOCH, R.J. & KERTESZ, Z.I. Recent developments of practical significance in the field of pectin enzymes. Food Technol., Chicago, 3:94-6, 1949.
- 44 - McCOLLOCH, R.J. et al. Pectic enzymes. VII. The preparation of tomato pectin-methylesterase. Arch. Biochem., New York, 10:479-84, 1946.
- 45 - McCREADY, R.M. & McCOMB, E.A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. Anal. Chem., Washington, 24(12):1986-8, 1952.

- 46 - MILLER, L. & MacMILLAN, J.D. Purification and pattern of action of pectinesterase from Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum. Biochemistry, Washington, 10(4):570-6 , 1971.
- 47 - NAGEL, C.W. & PATTERSON, M.E. Pectic enzymes and development of the pear (Pyrus communis). J. Food Sci., Chicago , 32(3):294-7, 1967.
- 48 - NAGY, S. & SHAW, P.E. Tropical and subtropical fruits. Westport, AVI, 1980. p. 1-3, 48-52, 316-40.
- 49 - NAKAGAWA, H. et al. Pectolytic enzyme. IV. Purification of tomato fruit pectinesterase. Agric. biol. Chem., Tokyo, 34(7):991-7, 1970.
- 50 - NAKAGAWA, H. et al. Pectolytic enzyme. V. Some properties of purified tomato pectinesterase. Agric. biol. Chem., Tokyo, 34(7):998-1003, 1970.
- 51 - PALMER, J.K. The banana. In: HULME, A.C. The biochemistry of fruits and their products. London, Academic Press, 1971, p.65-105.
- 52 - PITHAWALA, H.R. et al. Characterization of tomato pectinesterase. Arch. Biochem., New York, 17:235-48, 1948.
- 53 - PRESSEY, R. & AVANTS, J.K. Multiple forms of pectinesterase in tomatoes. Phytochemistry, Oxford, 11(11):3139-42, 1972.
- 54 - PRESSEY, R. et al. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. J. Food Sci., Chicago, 36(7):1070-3, 1971.

- 55 - PURI, A. et al. Partial purification and characterization of potato pectinesterase. Food Chem., Barking, 8(3):203-13, 1982.
- 56 - SCHULTZ, T. et al. Influence of method of deesterification on the viscosity and acid behavior of pectinic acid solutions. J. phys. Chem., Washington, 49:554-63, 1945.
- 57 - SPEISER, R. & EDDY, C.R. Effect of molecular weight and method of deesterification on the gelling behavior of pectin. J. Amer. chem. Soc., Washington, 68:287-93, 1946.
- 58 - TERMOTE, F. et al. Stabilization of cloud in pectinesterase active orange juice by pectic acid hydrolysates. J. Food Biochem., Westport, 1(1):15-34, 1977.
- 59 - VAN BUREN, J.P. et al. Pectin methylesterase in snap beans. J. Food Sci., Champaign, 27:291-4, 1962.
- 60 - VERSTEEG, C. et al. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. J. Food Sci., Chicago, 45(4):969-71, 998, 1980.
- 61 - WOOD, P.J. & SIDDIQUI, I.R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. Anal. Biochem., Baltimore, 39(2):418-28, 1971.
- 62 - WOODMANSEE, C. W. et al. Chemical changes associated with the ripening of apples and tomatoes. Food Res., Champaign, 24:503-14, 1959.

ABSTRACT

Pectinesterase (E C 3.1.1.11) was extracted from papaya (Carica papaya L.) tissue and purified 4,48 fold by fracionated ammonium sulphate precipitation, dialysis and chromatography on DEAE-celulose and Sephadex G-100.

Extraction conditions of enzyme were studied and their properties characterized. The increase on the activity of pectinesterase was practically followed by increase on the content of soluble pectin, during ripening. The molecular weight of the enzyme eluted in one peak of activity was 53.000 daltons.

The pectinesterase has its maximum activity at pH 8,0 and at 0,2 M of NaCl. Optimum temperature for the enzyme assay was 60°C. The enzymatic reaction was linear with the time and protein concentration. With citric pectin as substrate, pectinesterase had a K_m of 0,012% and was inhibited competitively by polygalacturonic acid with a K_i of 0,007%. Papaya pectinesterase was inhibited by sucrose, glucose and glicerol.