

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE EM FRUTOS DE CAFÉ

VITORINO, P.F.P.G.¹; ALVES, J.D.²; MAGALHÃES, M.M.³; LIMA, L.C.O.⁴ e MEYER, L.E.⁵

¹Eng^a-Agr^a. Doutoranda Fisiologia Pós Colheita/ DCA/UFLA. Lavras -MG Caixa Postal 37-CEP-37200.000 <vitorino@ufla.br>; ²Prof. Dr. DBI/UFLA Caixa Postal 37-CEP-37200.000; ³Bolsista - CNP&D- café DBI/UFLA Caixa Postal 37-CEP-37200.000; ⁴Prof. Dr. DCA/UFLA Caixa Postal 37-CEP-37200.000; ⁵Iniciação Científica- Agronomia- DBI/UFLA Caixa Postal 37-CEP-37200.000

RESUMO: Polifenoloxidase (PPO) é uma enzima envolvida em vários processos metabólicos nas plantas, mas seu papel ainda não se encontra muito bem definido. Quando isolada, a PPO catalisa a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis e/ou oxidação de *o*-difenóis para *o*-diquinonas. Este trabalho teve por objetivo o isolamento e a purificação da PPO em frutos de café no estágio chumbinho. Amostras de frutos de café foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -86°C. Após liofilização, o extrato foi aplicado em Fenil Sefarose e DEAE. A série cromatográfica utilizada nesta pesquisa permitiu um fator de purificação de 364. A atividade confirmada em SDS-PAGE e os resultados do Western blot sugerem a existência de uma banda de peso molecular de 63 kDa da PPO.

Palavras-chave: café, polifenoloxidase, isolamento, purificação.

ISOLATION AND PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE IN COFFEE FRUITS

ABSTRACT: Polyphenoloxidase (PPO) is one enzyme involved in various metabolic process in plants but its role remains hard to define. When isolated, PPO can catalyze one or both of the following reactions: the hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols, and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones. This paper aimed to isolate and purify the PPO in coffee fruits in pinhead stage. Coffee fruits were collected, frozen in liquid nitrogen, stored at - 86°C. After liophylation, the extract was applied in Fenil Sefarose and DEAE. The chromatographic serie used in this research gave a purification factor of 364. Activity stained SDS-PAGE gels and Western blots probed with PPO antibodies suggested existence of a 63 kDa PPO.

Key words: coffee, polyphenoloxidase, isolation, purification.

INTRODUÇÃO

Polifenoloxidase (PPO) é uma enzima cúprica encontrada em várias espécies de plantas. Ainda que a sua verdadeira função não tenha sido bem esclarecida, sabe-se que a PPO catalisa a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e/ou oxidação de *o*-difenois para *o*-diquinonas. (Robinson e Eskin, 1991). Em função dessas transformações, as quinonas, por serem muito reativas, interagem com outras moléculas, formando uma grande variedade de compostos de coloração escura que podem não ser resultados diretos da atividade da PPO (Eskin, 1990; Mayer e Harel, 1991). Vários estudos têm sido conduzidos com relação à PPO, descrevendo seu isolamento, sua caracterização e purificação (Chevalier et al., 1999; Kwok-Ki Ho, 1999). Como resultados destas pesquisas, atualmente já se tem conhecimento, para outras culturas, da cinética enzimática, do padrão eletroforético e das seqüências regulatórias da PPO. Apesar de ser muito estudada em frutos de café, verifica-se ausência de estudos envolvendo isolamento e purificação dessa enzima. Este trabalho teve por objetivo o isolamento e a purificação da PPO em frutos de café no estágio chumbinho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de frutos de café da cultivar Catuaí, na fase chumbinho, foram coletadas em propriedade no município de Lavras-MG, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, transportadas para o laboratório e armazenadas a -86°C. Após liofilização, 10 g desse material foram submetidos à extração utilizando a metodologia proposta por Mazzafera e Robinson (2000). A PPO foi extraída com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, contendo 2% de ácido ascórbico e 20% de PVPP (p/p). Após agitação por 10 minutos, o extrato foi centrifugado a 36.000g por 20 minutos e o sobrenadante filtrado em minicolunas PD-10 Sefadex G-25. Todas as etapas da extração e purificação foram conduzidas a 4°C, de acordo com a metodologia proposta por (Chevalier et al., 1999).

Algumas proteínas foram removidas em uma precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 30% de saturação. O sobrenadante resultante foi submetido a uma diálise de 12 horas contra um tampão fosfato pH 6,5 contendo KCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ambos a 0,6 M) e posteriormente eluído em uma coluna Fenil Sefarose (8 x 2,5 cm, 40 mL de volume) equilibrada com o mesmo tampão em um fluxo de 1,5 mL/min. Após a eluição das proteínas não-ligadas, a PPO foi eluída usando o mesmo

tampão contendo KCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1 M). A absorbância a 280 nm e a atividade da PPO foram determinadas em cada fração de 7 mL. As frações ativas foram combinadas, dialisadas por 12 horas contra tampão fosfato (pH 5,8) e aplicadas em uma coluna DEAE Sefarose pré-equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída e a proteína monitorada pela absorbância a 280 nm. Após a absorbância ter retornado à linha de base, fez-se a eluição através de um gradiente linear de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 0,25 mM em um tampão fosfato 10 mM pH 5,8. O fluxo foi mantido constante em 1mL/min, sendo a absorbância e a atividade da PPO determinadas em cada fração de 5 mL.

A SDS-PAGE foi conduzida de acordo com o método de Laemmli (1970) utilizando o sistema de minigel da Bio-Rad. As amostras continham 15 μg de proteínas totalmente desnaturadas e foram separadas em um gel de poliacrilamida cuja concentração foi de 12,5%. A PPO foi detectada utilizando o método de Imunoblotting descrito por Fraignier et al. (1995), citados por Chevalier et al. (1999), com o anticorpo/anti apple PPO (gentilmente fornecido por Laurence Marques, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France). A reação com o segundo anticorpo foi conduzida utilizando o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti-rabbit IgG. O primeiro e o segundo anticorpos foram diluídos 1.000 e 15.000 vezes, respectivamente. Os padrões de pesos moleculares utilizados foram da Bio-Rad.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos procedimentos de purificação encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo das etapas de purificação da polifenoxidase em frutos jovens

Estágio de Purificação	Volume (mL)	Atividade uni/min.g	Proteínas (mg)	Atividade específica uni/min.mg.prot	Fator de purificação
Extrato cru	20	26,37	52,83	0,499	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30%)	20	5,802	46,250	1,25	2,5
Fenil Sefarose	7	21,857	1,7208	12,70	25,45
DEAE	5	15,2857	0,084	181,97	364,6

Os estudos utilizando a metodologia preconizada por Mazzafera e Robinson (2000) permitiram evitar a oxidação de fenóis para a extração da polifenoxidase, utilizando: temperaturas próximas de 0°C, antioxidantes como o ácido ascórbico 2% (p/v) e PVPP 20%

(p/p). Essa estratégia proporcionou a obtenção de um extrato límpido após a dessalinização em colunas PD-10. O rendimento de proteínas encontradas no extrato bruto apresentou valores semelhantes aos verificados por Mazzafera e Gonçalves (2000).

Na fase inicial, a precipitação do extrato proteico com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permitiu um aumento na purificação da PPO, que permaneceu em solução, de 2,5 vezes. Na etapa seguinte, o extrato dessalinizado foi aplicado na coluna Fenil Sefarose, e a interação hidrofóbica entre a resina e a PPO foi decrescida pela adição do tampão contendo KCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M (Figura 1). Nesta fase, as proteínas não ligadas foram eluídas inicialmente, por volta da oitava fração, quando se utilizou um tampão fosfato contendo os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KCl numa concentração mais elevada, 0,6 M. A PPO foi eluída em um único pico, na seqüência, diminuindo a concentração dos sais para 0,1 M. Essa interação diferenciada da mistura com a resina permitiu um fator de purificação de 25. Valores próximos a este foram obtidos para extratos da PPO de pera (Gaillard e Richard Forget, 1997) e feijão (Paul e Gouda, 2000).

Prosseguindo a purificação, os extratos das cinco frações na faixa do pico de atividade da PPO foram combinados e aplicados na DEAE (Figura 2). A PPO foi eluída novamente em um único pico, anterior ao das proteínas, a partir de um gradiente crescente de sulfato de amônio de 0 a 0,25 M em tampão fosfato. Percebe-se uma eluição diferencial de grupos de proteínas no perfil dessa coluna aniônica, o que contribuiu para um fator final de purificação da PPO de 364. Processos de purificação da PPO realizados em feijão (Robinson e Dry, 1992), pera (Rivas e Whitaker, 1973), feijão de corda (Paul e Gouda, 2000), chá (Halder e Bhaduri, 1998) e damasco (Chevalier et al., 1999) obtiveram valores próximos de 350 de purificação.

Paralelamente às corridas cromatográficas, foram realizadas corridas de SDS-PAGE, em que se verificou o aparecimento de bandas com peso molecular variando entre 64 kDa e 29 kDa (Figura 3). Em estudos de caracterização dessa enzima em extratos bruto de folhas de café (Mazzafera e Robinson, 2000) foi constatada a presença de uma proteína com peso molecular próximo de 67 kDa, a qual foi convertida para 45 kDa devido à ação de proteinases. A multiplicidade dessas formas tem sido atribuída a um ou mais processos, como polimerização, glicosilação, proteólises e pontes dissulfídricas (Kwok-Ki Ho, 1999). Segundo Fraignier et al. (1995) e Marques et al. (1994), essas formas de PPO apresentam atividade, fato este que também ocorreu em nossos resultados. Em condições totalmente desnaturantes, nossos resultados coincidem com as formas encontradas pelos autores anteriormente, apresentando pesos moleculares de aproximadamente 29 kDa e 63 kDa. Estudos recentes com folhas (Mazzafera

2000; Robison e Dry 1992) e frutos (Murata et al., 1993; Chevalier et al., 1999; Change-Peng Yang, 2001) demonstraram também que a principal forma de PPO é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 63 kDa.

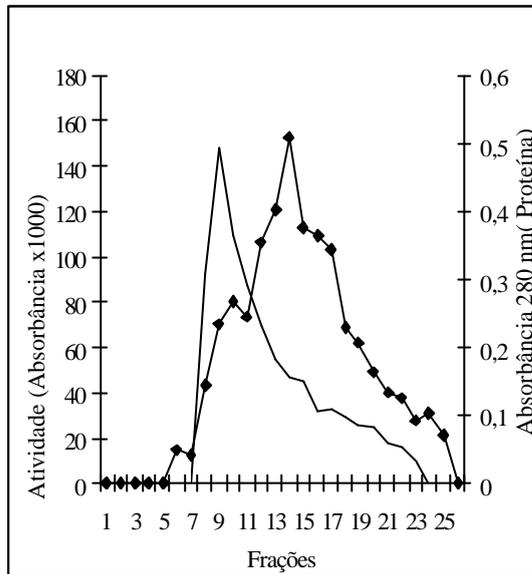


Figura 1 - Perfil da separação do extrato na coluna de Fenil Sefarose. absorbância a 280 nm () e atividade da PPO (◆).

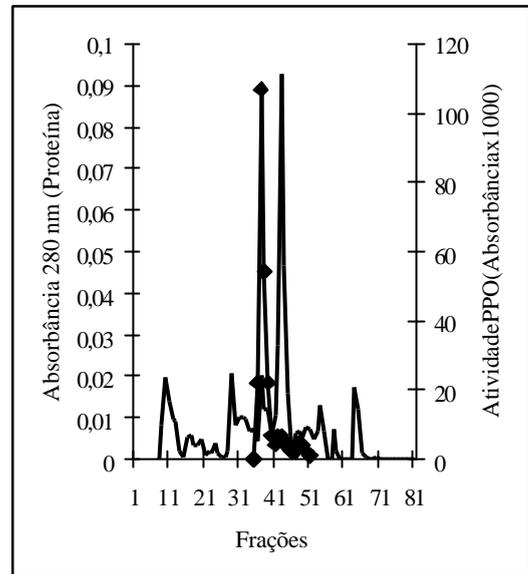


Figura 2 - Perfil da separação do extrato na coluna DEAE Sefarose. absorbância a 280 nm () e atividade da PPO (◆).

Em nosso trabalho possivelmente ocorreu uma hidrólise parcial da proteína de 63 kDa, originando a proteína de 29 kDa (Figura 3). No entanto, quando realizamos o Western blot, o anticorpo utilizado oriundo da PPO de maçã reagiu especificamente com a proteína de 63 kDa (Figura 4), comprovando que existem pequenas diferenças imunológicas entre essas formas.

A isoforma da PPO detectada no presente trabalho, com o anticorpo, foi de aproximadamente 64 kDa, que é considerada como latente (Marques et al., 1994); no entanto, retém toda a seqüência responsável para a atividade da enzima, como verificado nas Figuras 1 e 2.

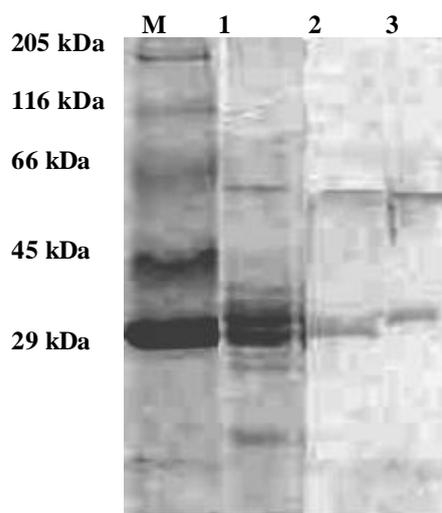


Figura 3 - SDS-PAGE perfil de café (15µg de proteína). **Linha 1** – extrato bruto, **linha 2** - fração principal da Fenil sefarose e **linha 3** - fração principal da DEAE-Sefarose.

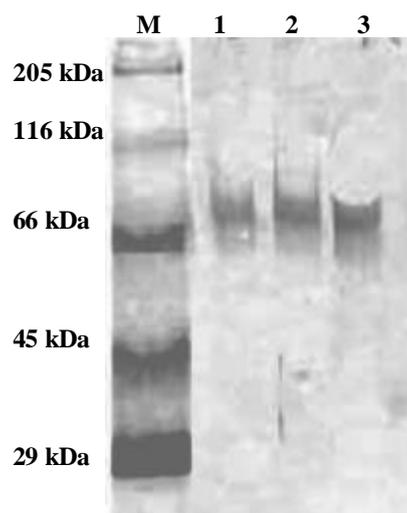


Figura 4 - Western blot de extrato bruto de frutos de café revelado com anticorpo-antiapple PPO. **Linha 1** – extrato bruto, **linha 2** - fração principal da Fenil sefarose e **linha 3** - fração principal da DEAE-Sefarose.

CONCLUSÕES

A série cromatográfica adaptada neste trabalho permitiu uma eficiente purificação da PPO em frutos de café. Essa purificação foi confirmada pelo Western blot.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANG-PENG, Y.; FUJITA, SHUJI, KOHNO, K.; KUSUBAYACHI, A.M.D. ASHRAFUZZAMAN., HAYASHI, N. Partial purification and Characterization of Polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) Peel. **J. Agric. Food. Chem** v.49, p.1446-1449, 2001.
- CHEVALIER, T.; RIGAL, D.; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; FILS-LYCAON.R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenoloxidase. **Plant Physiology**, v.119, p.1261-1270, 1999.
- ESKIN, N.A.M. **Biochemistry of Foods**, 2ªed., Academic Press, New York, 1990, pp.401-432.
- FRAIGNIER, M.P.; MARQUÉS, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J.J. Biochemical and Immunochemical characteristics of Polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v.43, p.2375-2380, 1995.

- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F. Polyphenoloxidases from Williams Pear (*Pyrus communis*L, cv Williams): Activation, Purification and Some Properties. **Journal Science of Food Agriculture**, v.74, p-49-56, 1997.
- HALDER, J.; TAMULI, P.; BHADURI, A.N. Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (*Camelia sinensis*). **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.9, n.2, p.75-80, 1998.
- KWOK-KI, HO.; Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* 'Christine 130'. **Plant Physiology Biochemistry** v.37, p.841-848, 1999.
- MARQUES, L.; FLEURIET, A.; CLEYET-MAREL, J.C.; MACHEIX, J.J. Purification of an apple polyphenoloxidase isoform resistant to SDS-proteinase K digestion. **Phytochemistry** v.36 n 5, p.1117-1121, 1994.
- MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S.P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, v.55, p.285-296, 2000.
- MURATA, M.; KUROKAMI, S.; MATSUHASHI, C. Immunochemical and immunohistochemical study of apple chlorogenic acid oxidase. **J. Agric. Food. Chem.**, v.41, p.1385-1390, 1993.
- PAUL, B.; GOWDA, L.R. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). **J. Agric. Food. Chem.**, v.48, p.3839-3846, 2000.
- ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M. Polyphenol oxidase. Oxidative enzymes in foods. New York, p.217-273, 1991.
- ROBINSON, S.P.; DRY, I.B. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60- kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. **Plant Physiology**, v.99, p.317-323, 1992.
- RIVAS, N.J.; WHITAKER, J.R. Purification and some properties of two polyphenol oxidases from bartlett pears. **Plant Physiology**, v.52, p.501-507, 1973.