

Área: Engenharia de Alimentos

PURIFICAÇÃO DE EXO-POLIGALACTURONASE POR PRECIPITAÇÃO COM ÁLCOOL ETÍLICO

Márcia Santin Trentini*, Viviane Astolfi, Eunice Valduga, Marco Di Luccio

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS

*E-mail: marciasantin@yahoo.com.br

RESUMO – A utilização de processos de precipitação utilizando álcool etílico, preparado em diferentes concentrações (10, 22, 50, 78 e 90%) e bombeado em diferentes vazões (0,09, 2,97, 10, 17 e 19,9 mL/min) ao extrato enzimático (10 mL), foi possível obter fatores de purificação (FP) de 1,3 vezes e recuperações (R) de 51,32% da enzima exo-poligalacturonase (exo-PG) fase sobrenadante. A adição de concentrações abaixo de 10% de álcool etílico com vazões abaixo de 10 mL/min mostrou ser a região otimizada em relação à recuperação.

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre estratégias de purificação que utilizem processos simples e de baixo custo, mas que possibilitem alcançar altos fatores de purificação e recuperação da enzima são importantes do ponto de vista industrial. O aumento do grau de pureza das preparações enzimáticas, sem aumentar o custo final da enzima, pode contribuir para aumentar o número de aplicações industriais destas enzimas, melhorando a qualidade final de diversos produtos que podem se beneficiar da tecnologia enzimática. Ainda, preparados enzimáticos mais puros e concentrados implicam em maior rendimento na sua aplicação, pois concentrações menores podem ser utilizadas, desta maneira insere-se o objetivo do trabalho que visa o estudo de processos de precipitação, utilizando álcool etílico, na purificação das enzimas pectinases bioproduzidas pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução de pectinases

A cepa do *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi utilizada na bioprodução de pectinases segundo metodologia descrita por Gomes *et al.* (2011).

2.2 Purificação por precipitação com álcool etílico

A solução de etanol (Nuclear 99,5 °GL) foi preparado em diferentes concentrações (10, 22, 50, 78 e 90%) e bombeada em diferentes vazões de 0,09, 2,97, 10, 17 e 19,9 mL/min, ao extrato enzimático (10 mL), sendo este mantido em banho de gelo a 4°C, sob agitação lenta. Após o bombeamento, as amostras eram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. As análises foram realizadas das amostras do precipitado e do sobrenadante. Nos ensaios avaliou-se o fator de purificação e recuperação.

2.3 Atividade Enzimática

A atividade da Exo-PG foi determinada segundo método descrito por Miller (1959), modificado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 apresentam as matrizes do planejamento fatorial completo 2^2 , com os valores codificados (reais), dos ensaios de precipitação com etanol e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da enzima exo-PG na fase precipitada (Tabela 3) e sobrenadante (Tabela 4).

TABELA 1: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , valores codificados (reais) da precipitação com álcool etílico fase precipitado e respostas em fator de purificação e recuperação.

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG	
	Concentração	Vazão	FP	R (%)
	(%)	(mL/min)		
1	-1 (22)	-1 (2,97)	0	1,23
2	+1 (78)	-1 (2,97)	0,09	12,17
3	-1 (22)	+1 (17)	0,02	1,75
4	+1 (78)	+1 (17)	0,27	9,41
5	-1,41 (10)	0 (10)	0,01	2,16
6	+1,41 (90)	0 (10)	0,05	8,22
7	0 (50)	-1,41 (0,09)	0,17	28,78
8	0 (50)	+1,41 (19,9)	0,11	13,63
9	0 (50)	0 (10)	0,28	29,85
10	0 (50)	0 (10)	0,29	29,69
11	0 (50)	0 (10)	0,33	31,19

TABELA 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , valores codificados (reais) da precipitação com álcool etílico fase sobrenadante e respostas em fator de purificação e recuperação.

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG	
	Concentração	Vazão	FP	R (%)
	(%)	(mL/min)		
1	-1 (22)	-1 (2,97)	0,19	65,94
2	+1 (78)	-1 (2,97)	0,08	12,44
3	-1 (22)	+1 (17)	0,33	50,17
4	+1 (78)	+1 (17)	0,07	9,29
5	-1,41 (10)	0 (10)	0,16	58,35
6	+1,41 (90)	0 (10)	0,02	3,29

7	0 (50)	-1,41 (0,09)	0,34	29,38
8	0 (50)	+1,41 (19,9)	0,09	16,62
9	0 (50)	0 (10)	1,30	46,26
10	0 (50)	0 (10)	1,30	51,32
11	0 (50)	0 (10)	0,69	42,25

Com o auxílio do software Statistica 5.1, os resultados dos experimentos foram analisados a fim de se verificar o comportamento das variáveis estudadas no fator de purificação (FP) e recuperação (R) das enzimas pectinases na fase precipitada e sobrenadante utilizando álcool etílico. A análise foi realizada através do erro puro, identificando os coeficientes de regressão significativos com 95% de confiança.

A equação 1a apresenta o modelo codificado para o FP e a equação 1b para a R da enzima exopoligalacturonase (exo-PG) fase precipitada. Observa-se que no intervalo estudado, o FP e a R são função da concentração do álcool e vazão da reação. Na Tabela 3 e 4 encontram-se os resultados da análise de variância. Pode-se dizer que o modelo é válido estatisticamente, pois o $F_{\text{calculado}}$ apresentou-se 2,3 e 10,34 vezes maior que o F_{tabelado} , para o caso da regressão em relação aos resíduos, no planejamento analisado.

Tabela 3: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando o fator de purificação como resposta

Fonte de Variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	0	3	0,04	10,00
Resíduo	0	7	0,004	
Falta de ajuste	0,028	5		
Erro puro	0,001	2		
Total	1,578	10		

$R=0,90$; $F_{\text{tabelado } 3;7} = 4,35$

Tabela 4: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando a recuperação como resposta

Fonte de Variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	1256	3	418,60	44,97
Resíduo	65	7	9,31	
Falta de ajuste	63,79	5		
Erro puro	1,357	2		
Total	1320,94	10		

$R=0,97$; $F_{\text{tabelado } 3;7} = 4,35$

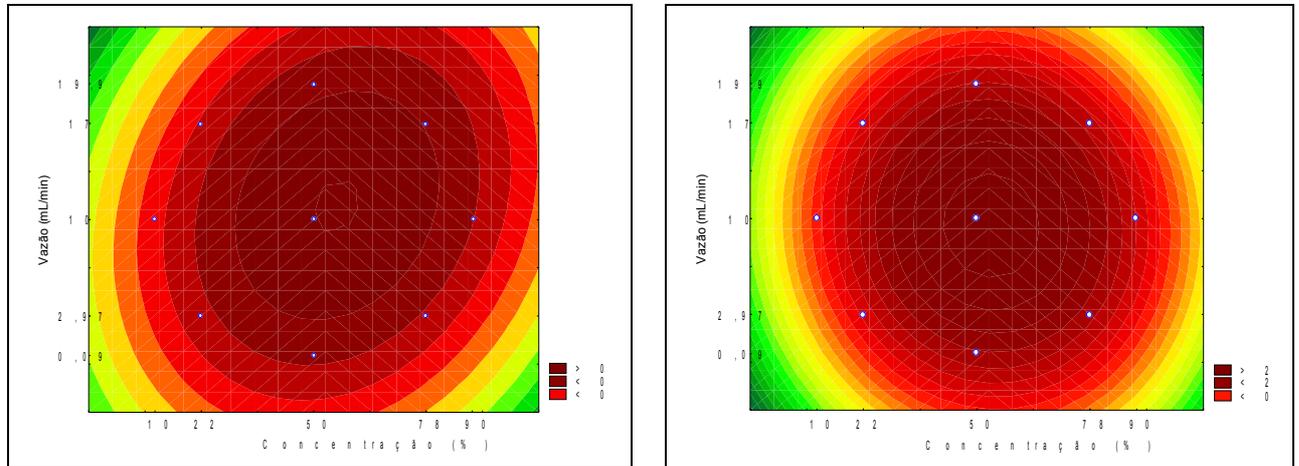
$$FP = 0,299 + 0,05(C) - 0,133(C)^2 - 0,078(V)^2 \quad (\text{Equação 1a})$$

$$R = 30,26 + 3,40(C) - 13,69(C)^2 - 8,29(V)^2 \quad (\text{Equação 1b})$$

onde, FP= fator de purificação; R= recuperação; C= concentração do álcool; V= vazão da reação.

Os modelos empíricos permitiram a construção das curvas de contorno, apresentadas na Figura 1a e 1b. Pode-se observar nitidamente nas Figuras que a concentração do álcool etílico e a vazão da reação, na faixa estudada, influenciam no FP e R da enzima PG, sendo as condições do ponto central a região otimizada para ambas variáveis. Os resultados obtidos para esta enzima não foram satisfatórios em termos de FP e R.

FIGURA 1: Curva de contorno: fator de purificação (a) e recuperação (b) da enzima PG fase precipitada álcool etílico.



Utilizando álcool etílico, a fase sobrenadante foi a que apresentou maior FP (1,3) e R (51,32%) da enzima PG em comparação com a fase precipitada. O FP da enzima na fase sobrenadante não apresentou efeito significativo. A Tabela 5 encontra-se os resultados da análise de variância para R da enzima PG fase sobrenadante do planejamento. Pode-se dizer que os modelos são válidos estatisticamente, pois o $F_{\text{calculado}}$ apresentou-se 6,12 vezes maior que o F_{tabelado} , para o caso da regressão em relação aos resíduos, no planejamento analisado. A equação 2 apresenta o modelo codificado para a recuperação do planejamento, respectivamente. Verificou-se um bom ajuste entre os valores observados experimentalmente ao modelo proposto. A análise estatística confirma que a concentração e a vazão de reação, nos intervalos utilizados, afetam a R da enzima, para o sistema estudado.

Tabela 5: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando a recuperação como resposta

Fonte de Variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	4120	2	2059,84	27,30
Resíduo	604	8	75,44	
Falta de ajuste	562,21	6		
Erro puro	41,32	2		
Total	4723,21	10		

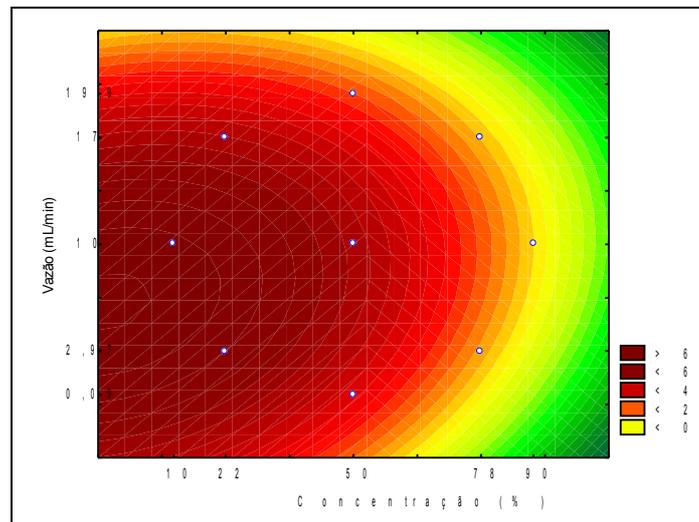
$R=0,934$; $F_{\text{tabelado } 2;8} = 4,46$

$$R = 46,58 - 21,57(C) - 9,93(V)^2 \quad (\text{Equação 2})$$

onde, R= recuperação; C= concentração do álcool; V= vazão da reação.

A adição de concentrações abaixo de 10% de álcool etílico com vazões abaixo de 10 mL/min mostrou ser a região otimizada em relação à R da enzima PG fase sobrenadante, conforme a Figura 2. A análise do FP da enzima PG da fase sobrenadante não apresentou efeito significativo.

FIGURA 2: Curva de contorno: recuperação (%) da enzima PG fase sobrenadante álcool etílico.



4 CONCLUSÃO

Utilizando a precipitação com solvente álcool etílico foi possível obter FP de 1,3 vezes e R de 51,32% da enzima exo-PG fase sobrenadante, a adição de concentrações abaixo de 10% de álcool etílico com vazões abaixo de 10 mL/min mostrou ser a região otimizada em relação à recuperação.

5 AGRADECIMENTOS

CAPES, URI Campus de Erechim.

6 REFERÊNCIAS

- GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, V. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 281-287, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.