

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia Blológica
Escola de Engenharia
Universidade do Minho

2005



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Tese de doutoramento

Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyveromyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Quimica e Biológica

Martinha Susana Alves Pereira

Departamento de Engenharia BIológica
Escola de Engenharia
Universidade do Minho

2005

Aos meus pais
Ao Esser, Carolina e Constança

AGRADECIMENTOS

A dissertação que agora termino resultou de quatro anos de trabalho no Departamento de Engenharia Biológica na Universidade do Minho. Ao longo deste tempo, várias foram as pessoas que me ajudaram e sempre incentivaram para que o trabalho fosse concluído. A essas pessoas gostaria de deixar algumas palavras.

Em primeiro lugar, o meu agradecimento aos meus orientadores Professor José A. Teixeira e Professor Armando Venâncio.

Ao Professor José A. Teixeira agradeço a oportunidade que me deu para a realização do trabalho. O seu conhecimento científico aliado às suas características humanas tornaram, principalmente nas alturas menos boas, este trabalho bem mais motivador.

Ao Professor Armando Venâncio agradeço-lhe a valiosa transmissão de conhecimentos, o apoio e amizade sempre demonstrados no decorrer do trabalho.

I would like to express my gratitude to You Ting Wu for sharing with me his valuable knowledge, his work and friendship.

Ao Professor Manuel Mota, na qualidade de Director do Centro de Engenharia Biológica, pelo seu acolhimento como investigadora e pelas facilidades concedidas durante a execução do trabalho.

Ao Pedro Madeira, Sandra Carvalho e Inês Castro a ajuda na realização de algum trabalho experimental. Agradeço-lhes a perseverança e empenho demonstrado durante todas as tarefas assim como toda a amizade e apoio.

Agradeço também às pessoas do Centro de Engenharia Biológica, e especialmente aos colegas do Laboratório de Fermentações, que sempre demonstraram amizade e optimismo, principalmente nas alturas em que o trabalho é uma obsessão.

Durante a fase de escrita da dissertação gostaria de agradecer à Mariana Santos e ao Pablo Kroff. À Mariana, a sua incondicional amizade, o seu incentivo para que o trabalho fosse concluído e a sua ajuda ao substituir-me em alguns

compromissos profissionais. Ao Pablo, para além da sua amizade, as suas interessantes sugestões, trabalho e horas dispendidas, principalmente as de sono, na formatação da dissertação.

Aos meus familiares e amigos agradeço a amizade, apoio e compreensão pelas minhas horas de ausência.

Devo também os agradecimentos às instituições que, pelo apoio financeiro concedido, tornaram possível a realização deste trabalho. À FCT pela bolsa de doutoramento Praxis XXI BD/18060/98, ao CEC (INCO-DC), projecto ERB IC18 CT97 0182, pelo financiamento do projecto e também à Fundação Calouste Gulbenkian pela atribuição de uma bolsa para deslocação a um congresso.

Por último, dedico esta dissertação aos meus pais, Joaquim e Antónia, sempre o meu porto de abrigo, ao meu marido, Esser, e às minhas filhas, Carolina e Constança, que são, os três, a minha fonte de motivação.

SUMÁRIO

Com o trabalho presente nesta dissertação pretendeu-se estabelecer procedimentos para a purificação da enzima endo-poligalacturonase, produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. Para tal foram usados os sistemas de duas fases aquosas.

As estirpes provenientes da fermentação do cacau foram estudadas para encontrar a melhor produtora de enzima utilizando, como fonte de carbono, a glucose ou a sacarose. Foram seleccionadas as estirpes CH4-1, CH0-1 e CCT 3172. Para esta última estirpe, foram realizados ensaios em que se verificou que a produtividade da enzima era máxima quando somente era utilizada a agitação mecânica, sem introdução de ar.

Para os ensaios de purificação foram determinados alguns diagramas de fases, cuja informação foi utilizada nos ensaios de partição e extracção.

Foram realizados ensaios de partição para vários sistemas de duas fases aquosas. Verificou-se que os sistemas mais adequadas para a partição da enzima são os sistemas de composição 24 % PEG-5,6 % $(NH_4)_2SO_4$ e 6,9 % PEG8000-8,7 % PVA (percentagens mássicas). Foram propostos 2 esquemas de separação. O primeiro, constituído por um sistema de composição 24 % PEG-5,6 % $(NH_4)_2SO_4$, cujo objectivo foi a extracção da enzima, em série com um segundo que, por adição de mais sal, permitia a recuperação do PEG. O factor de purificação obtido foi de 1,25 e factor de concentração entre 5 e 8. Este esquema promovia a concentração da endo-PG.

O segundo esquema tem como objectivo a purificação e a concentração. Para tal é utilizado um sistema de composição 6,9 % PEG8000-8,7 % PVA, seguido de outro de composição 24 % PEG-5,6 % $(NH_4)_2SO_4$. Foram obtidos factores de purificação e concentração de 1,87 e 5,2, respectivamente. A recuperação da enzima foi de 91 %.

Os polímeros termossensíveis foram também estudados. Foi proposto um esquema de separação, baseado no sistema 27 % Ucon – 2,2 % $(NH_4)_2SO_4$ que permitia a purificação e concentração da enzima e, concomitantemente, a recuperação do Ucon, por aumento da temperatura. Foram alcançados factores de concentração de 10 com recuperação de enzima superiores a 95 %.

Com este trabalho foram propostos 3 esquemas de extracção, que se verificaram adequados para a purificação da enzima endo-poligalacturonase.

Palavras chave: endo-poligalacturonase, *Kluyveromyces marxianus*, sistemas de duas fases aquosas, polímeros termossensíveis.

ABSTRACT

The aim of the work presented in this thesis was the establishment of procedures for the purification of the enzyme endo-polygalacturonase, obtained by *Kluyveromyces marxianus* fermentation. For that purpose, the aqueous two-phase extraction was used.
The strains, isolated from cocoa fermentation, were studied to find the best enzyme producer, using glucose or sucrose as carbon source. The strains CH4-1, CH0-1 e CCT 3172 were selected. For this last strain, some experiments were done, being possible to see that the enzyme productivity was higher when only mechanical stirring was used, without air injection.
Partition experiments were done using various aqueous two-phase systems. It was possible to see that the more suitable systems for enzyme extraction were the ones with the following composition: 24 % PEG-5.6 % $(NH_4)_2SO_4$ and 6.9 % PEG8000-8.7 % PVA. Two separation schemes were proposed. The first one, constructed for the system 24 % PEG-5.6 % $(NH_4)_2SO_4$, which objective was the enzyme extraction, in series with a second one that, with more salt addition, allows to the PEG recuperation. The purification factor obtained was 1.25 and the concentração factor was between 5 and 8. This scheme allows endo-PG purification.
The second scheme has the objective of purification and concentration. For that, a system with composition 6.9 % PEG8000-8.7 % PVA, followed by another of 24 % PEG-5.6 % $(NH_4)_2SO_4$, was used. Purification and concentration factor of 1.87 and 5.2, respectively, were obtained. The enzyme yield was 91 %.
The thermoseparating polymers were also studied. One separation scheme based on the system 27 % Ucon – 2.2 % $(NH_4)_2SO_4$, was proposed. This scheme allows enzyme purification and concentration and at the same time Ucon recuperation, by temperature increasing. Concentration factor of 10 and enzyme recuperation higher than 95 % were obtained.

Keywords: endo-polygalacturonase, *Kluyveromyces marxianus*, aqueous two-phase systems, thermoseparating polymers.

ÍNDICE

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	1
1.1	CONTEXTO E MOTIVAÇÃO	3
1.2	OBJECTIVOS	4
1.3	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	5
1.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
	CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	INTRODUÇÃO	11
2.2	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENDO-POLIGALACTURONASE	12
2.2.1	Pectinas	12
2.2.2	As enzimas pécticas	15
2.2.3	Produção e importância das enzimas pécticas	18
2.2.4	Endo-poligalacturonase	22
2.2.5	A levedura Kluyveromyces marxianus como produtora da endo-poligalacturonase	26
2.3	TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO	27
2.3.1	Cromatografia	27
2.3.2	Sistemas de duas fases aquosas	30
2.3.3	Diagrama de fases	31
2.3.4	Partição em sistemas de duas fases aquosas	37
2.3.5	Aplicações dos sistemas de duas fases aquosas	43
2.3.6	Sistemas de duas fases aquosas alternativos	46
2.3.7	Sistemas de duas fases aquosas com polímeros termossensíveis	48
2.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1	FERMENTAÇÕES DAS ESTIRPES DE LEVEDURA	71
3.1.1	Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura	71
3.1.2	Armazenamento das leveduras *Kluyveromyces marxianus*	71
3.1.3	Fermentações descontínuas em balões Erlenmeyer ou frascos rolhados ou reactor de 2 L	72
3.1.4	Preparação das amostras para determinação da actividade enzimática	74

ÍNDICE
(CONTINUAÇÃO)

3.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	74
3.2.1	Actividade da endo-poligalacturonase	74
3.2.2	Biomassa	79
3.2.3	Proteína	79
3.2.4	Açúcares redutores	80
3.2.5	Sacarose, Glucose e frutose	80
3.3	SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	81
3.3.1	Reagentes utilizados nos SDFA	81
3.3.2	Ligandos	82
3.3.3	Equipamento utilizado nos SDFA	83
3.3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
	CAPÍTULO 4 SELECÇÃO DAS ESTIRPES DE *K. marxianus* E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	85
4.1	INTRODUÇÃO	87
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	88
4.2.1	Estirpes utilizadas	88
4.2.2	Fermentações	89
4.2.3	Caracterização da enzima endo-pG no sobrenadante da fermentação	89
4.2.4	Determinação da estabilidade da enzima em função da temperatura	90
4.2.5	Métodos analíticos	91
4.3	RESULTADOS	91
4.3.1	Selecção de estirpes de *K. marxianus* utilizando glucose e sacarose como fonte de carbono	91
4.3.2	Efeito das condições de aerobiose ou anaerobiose na produção da enzima	94
4.3.3	Caracterização da enzima endo-PG no sobrenadante da fermentação	95
4.3.4	Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas	100
4.4	CONCLUSÕES	101
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	CAPÍTULO 5 DETERMINAÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES	105
5.1	INTRODUÇÃO	107
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	108
5.2.1	Reagentes	108
5.2.2	Determinação dos dados de equílibrio líquido-líquido	108
5.2.3	Métodos analíticos	109

ÍNDICE
(CONTINUAÇÃO)

5.3	RESULTADOS	110
5.3.1	Sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$	110
5.3.2	Sistema Ucon-PVA e Ucon-Reppal PES100	115
5.3.3	Sistema PEG8000 – PVA10000	118
5.4	CONCLUSÕES	119
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	CAPÍTULO 6 SEPARAÇÃO DA ENZIMA COM SDFA	123
6.1	INTRODUÇÃO	125
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	126
6.2.1	Produção da enzima endo-poligalacturonase	126
6.2.2	Reagentes	126
6.2.3	Preparação da amostra para os ensaios de partição	126
6.2.4	Ligandos	127
6.2.5	Preparação dos Sistemas para os Ensaios de Partição	127
6.2.6	Preparação dos Sistemas para os Ensaios de Extracção	127
6.2.7	Métodos Analíticos	128
6.2.8	SDS-PAGE	128
6.2.9	Coloração por nitrato de prata	131
6.3	RESULTADOS	133
6.3.1	Partição da endo-PG nos SDFA sem ligandos	133
6.3.2	Partição da endo-PG nos SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com ligandos	138
6.3.3	Extracção da endo-PG à escala laboratorial	140
6.3.4	Partição da enzima nos sistemas PEG-PVA	144
6.3.5	Esquema de separação para extracção da enzima	147
6.4	CONCLUSÕES	151
6.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
	CAPÍTULO 7 SEPARAÇÃO DA ENZIMA COM SDFA COM POLÍMEROS TERMOSSENSÍVEIS	155
7.1	INTRODUÇÃO	157
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS	158
7.2.1	Reagentes	158
7.2.2	Produção da enzima endo-poligalacturonase	158
7.2.3	Preparação da solução de enzima e SDFA para os ensaios de partição no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$	158
7.2.4	Preparação da solução de enzima e SDFA para os ensaios de Separação no Sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$	159
7.3	RESULTADOS	159
7.3.1	Partição da enzima endo-poligalacturonase	159
7.3.2	Separação da enzima enpoligalacturonase	162
7.4	CONCLUSÕES	171
7.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172

ÍNDICE
(CONTINUAÇÃO)

	CAPÍTULO 8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	175
8.1	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	177
8.2	TRABALHO FUTURO	181
	ANEXO CALIBRAÇÕES	183
1	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ENDO-PG	185
2	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BIOMASSA	187
3	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PROTEÍNA	188
4	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (DNS)	190
5	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SACAROSE (HPLC)	191
6	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA MASSA MOLECULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FILTRAÇÃO EM GEL	192
7	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRACÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO POLÍMERO	192

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Estrutura primária das substâncias pécticas. A cadeia primária consiste em unidades de ácido α-D-galacturónico com ligação α-(1→4) com 2-4 % de unidades de ramnose com ligações β-(1→2) e β-(1→4) às unidades de ácido galacturónico (Whitaker, 1990).

Figura 2.2 Reacções catalisadas pelos diferentes tipos de enzima sobre a pectina ou pectato.

Figura 2.3 Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas. Binodal (–■–), linha de ligação (–●–), região de uma fase (A), região de duas fases e composição total do sistema (B), sendo B' e B'' as composições das fases superior e inferior do sistema e ponto crítico (C).

Figura 2.4 Composições totais (A1, A2, A3 e B1, B2, B3) e respectivas composições das fases superior e inferior em equilíbrio (A', A'' e B', B'').

Figura 2.5 Representação esquemática de diferentes tipos de polímeros.

Figura 2.6 Representação esquemática da separação de um polímero termossensível em água, após o aquecimento (T>CPT), (adaptado de Persson, 1999).

Figura 2.7 Exemplos de alguns polímeros termossensíveis usados nos SDFA. (A) polímeros aleatórios de óxido de etileno e óxido de propileno (EOPO), (B) polímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno (EOPOEO ou POEOPO), (C) copolímeros de EOPO modificados hidrofobicamente (HM-EOPO), (D) polímeros de poli(N-isopropilacrilamida) ou poli(NIPAM), (E) polivinilcaprolatano ou poli(VCL), (F) poli(vinilmetiléter) ou poli(VME), (G) etil(hidroxietilcelulose) ou EHEC, (H) metilcelulose (MC).

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Percentagem dos valores de actividade enzimática encontrados em função da temperatura e pH (em relação a 40 ºC e pH=5, (Honda et al., 1982)). Temperatura (●), pH (◆).

LISTA DE FIGURAS
(CONTINUAÇÃO)

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Perfis de produção de biomassa, enzima e consumo de substrato para a estirpe CCT 3172, usando como fonte de carbono glucose (A) e sacarose (B). Biomassa (◆), actividade endo-PG (■) e consumo de substrato (●).

Figura 4.2 Perfis de actividade enzimática. (A) enzima produzida pela estirpe K. marxianus CCT 3172, (B) enzima produzida pela estirpe *K. marxianus* CH0-1. Actividade enzimática obtida nas porções recolhidas cada 3 minutos (■—■).

Figura 4.3 Perfis de variação da actividade da endo-PG ao longo do tempo para diversas temperaturas. 22 ºC (◆); 30 ºC (□); 40 ºC (●); 45 ºC (◇); 50 ºC (■), 60 ºC (○).

CAPÍTULO 5

Figura 5.1 Diagrama de fases para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$. (a) 22 ºC, (b) 30 ºC, (c) 40 ºC. Binodal (–■–); Composição total (●).

Figura 5.2 Binodais encontradas para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC, 30 ºC e 40 ºC. Binodal a 22 ºC (–●–), binodal a 30 ºC (–◆–) e binodal a 40 ºC (–■–)).

Figura 5.3 Binodal (–■–) e linha de ligação (—) para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC, binodal (…●…) e linha de ligação para o sistema EOPO 4000- $(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC (Li et al., 2000).

Figura 5.4 Diagrama de fases para o sistema Ucon 50-HB-5100-PVA a 22 ºC. Binodal (–■–); composição total (●).

Figura 5.5 Diagrama de fases para o sistema Ucon 50-HB-5100 - Reppal PES100 a 22ºC. Binodal (—■—); composição total (●). Binodal para o sistema Ucon 50-HB-5100 - Reppal PES100 a 20 ºC (Persson et al., 1998) (…….); binodal para o sistema Breox PUR A1000 - Reppal PES100 a 20 ºC (Persson et al., 1999) (— . —).

Figura 5.6 Diagrama de fases do SDFA PEG8000 - PVA10000 a 22 ºC. Binodal (—■—); composição total (●) para o sistema com PEG8000; binodal (▲—▲) para o sistema com PEG20000, como apresentado em Fisher and Sutherland (1989).

LISTA DE FIGURAS
(CONTINUAÇÃO)

CAPÍTULO 6

Figura 6.1 Partição da endo-poligalacturonase no SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC. A razão de volume de fases é de 1:1. PEG4000-$(NH_4)_2SO_4$ (—□—), PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ (—○—), PEG20000-$(NH_4)_2SO_4$ (—Δ—).

Figura 6.2 Partição da endo-poligalacturonase no SDFA PEG-fosfato a 25 ºC. A razão de volume de fases é de 1:1. PEG4000-fosfato (—□—), PEG8000-fosfato (—○—), PEG20000-fosfato (—Δ—).

Figura 6.3 Partição da enzima endo-PG no SDFA PEG8000 9,6 %-$(NH_4)_2SO_4$ 9,5 % a diferentes pH, a 25 ºC. O tampão utilizado foi 0,04 M de ácido cítrico-Na_2HPO_4.

Figura 6.4 Partição da enzima endo-PG em dois SDFA PEG-sal em função da razão do volume de fases, a 25 ºC. O TLL do SFDA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ é cerca de 15,8 %, e cerca de 17,7 % no SDFA PEG 4000-fosfato (pH=7). PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ (—□—), PEG4000-fosfato (—○—).

Figura 6.5 Actividade específica e recuperação da endo-PG na fase inferior em função da razão do volume de fases. O sistema usado foi PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação de 28 %. Actividade específica (—○—), recuperação da enzima (—Δ—).

Figura 6.6 Partição da proteína total nos SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ e PEG8000-fosfato (pH=7), a 25 ºC. A razão do volume de fases é cerca de 1:1. PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com solução A (—□—), PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com solução B (—○—), PEG-fosfato com solução A (—■—), PEG-fosfato com solução B (—●—).

Figura 6.7 Partição da endo-poligalacturonase no SDFA PEG8000 13 % -$(NH_4)_2SO_4$ 9,9 % utilizando ligandos, a 25 ºC. H-ER (—□—), H-E4R (—Δ—), MX-4RD (— + —), E-FR (—▽—), E-BNA (—x—), E-3RN (—◊—), MX-3R (—○—).

Figura 6.8 Representação esquemática da extracção da enzima no SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação moderado, cerca de 28 %, e uma razão de volume de fases entre 8 e 11.

LISTA DE FIGURAS
(CONTINUAÇÃO)

CAPÍTULO 7

Figura 7.1 Partição da enzima endo-PG (K_e) e da proteína total (K_p) no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC. K_e (—▪—) e K_p (—•—)).

Figura 7.2 Partição da endo-PG (K_e) nos sistemas Ucon-PVA10000 (—•—) e Ucon–Reppal PES 100 (—▪—), a 22 °C.

Figura 7.3 Representação esquemática do processo de extracção de endo-PG. Os valores entre parêntesis são a composição das fases e outras quantidades (líquidos ou sólido).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Percentagem das pectinas em diferentes frutos e vegetais (Jayani et al, 2005)

Tabela 2.2 Massas moleculares de substâncias pécticas, provenientes de diferentes fontes (adaptado de Sakai et al., 1993)

Tabela 2.3 Classificação extensiva das enzimas pécticas (adaptado de Jayani et al., 2005)

Tabela 2.4 Endo-poligalacturonases que foram purificadas e caracterizadas provenientes de várias fontes. Massa molecular (M); Ponto isoeléctrico (pI); pH e temperatura (T) óptimos para actuação da enzima

Tabela 2.5 Alguns métodos cromatográficos, princípio de operação e característica que permite a separação

Tabela 2.6 Partição de proteína e/ou enzima em sistemas de duas fases aquosas com adição por compostos de baixo molecular

Tabela 2.7 Partição por afinidade de proteínas

Tabela 2.8 Proteínas/Enzimas purificadas utilizando SDFA

Tabela 2.9 Aplicação do sistema de duas fases aquosas na partição de células (Albertsson, 1986)

Tabela 2.10 Exemplos de bioconversões extractivas efectuadas em SDFA

Tabela 2.11 Sistemas de duas fases aquosas constituídos por dois polímeros, indicados na literatura, como alternativa ao sistema PEG-dextrano

Tabela 2.12 Sistemas de duas fases aquosas constituídos por um polímero e um sal, referenciados na literatura

Tabela 2.13 Sistemas de duas fases aquosas utilizando polímeros termossensíveis e sua aplicação

LISTA DE TABELAS
(CONTINUAÇÃO)

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Estirpes de leveduras *K. marxianus* utilizadas na execução deste trabalho, e composição inicial da fonte de carbono no meio de cultura

Tabela 3.2 Reagentes utilizados e preparação do reagente de DNS segundo Miller (1959)

Tabela 3.3 Percentagem dos valores encontrados em relação às condições: diluição feita com água destilada, banho-maria termostatizado, na determinação da actividade enzimática (método baseado em Honda et al., 1982)

Tabela 3.4 Reagentes usados para determinação da actividade enzimática usando o método descrito por Honda et al. (1982)

Tabela 3.5 Reagentes utilizados nos sistemas de duas fases aquosas e respectiva origem

Tabela 3.6 Ligandos utilizados nos SDFA e respectivos comprimentos de onda máximos

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Concentração de biomassa e actividade enzimática para as estirpes testadas, usando a glucose (após 14 h de fermentação) e sacarose (após 16 horas de fermentação) como fonte de carbono

Tabela 4.2 Efeito das condições de aerobiose ou anaerobiose na conversão de glucose a biomassa ($Y_{(X/S)}$), na conversão de glucose a endo-PG ($Y_{(PG/S)}$), na actividade específica (Act. Esp.) e na produtividade em endo-PG (Q_{PG})

Tabela 4.3 Tempo de retenção (t_r) e tempo de lavagem (t_{lav}) para as soluções de enzima analisadas por FPLC; massa molecular (M) obtida para a enzima endo-PG

Tabela 4.4 Resultados obtidos através da filtração em gel para caracterização da enzima produzida por CH4-1, CCT 3172, CH0-1 e presente num complexo comercial (Pectinex Ultra SP-L, Novozymes, Dinamarca)

Tabela 4.5 Resultados obtidos na purificação da enzima endo-PG por troca-iónica

LISTA DE TABELAS
(CONTINUAÇÃO)

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por Ucon 50-HB-5100 e $(NH_4)_2SO_4$ a 22, 30 e 40 ºC

Tabela 5.2 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por Ucon 50-HB-5100 e PVA10000 a 22 ºC

Tabela 5.3 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por Ucon 50-HB-5100 e Reppal PES100 a 22 ºC

Tabela 5.4 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por PEG8000 e PVA10000 a 22 ºC

CAPÍTULO 6

Tabela 6.1 Composição e metodologia de preparação do gel de separação e do tampão TRIS/HCl/SDS para a realização da electroforese

Tabela 6.2 Composição e preparação do gel de empacotamento e do tampão necessário para a sua preparação

Tabela 6.3 Composição e preparação do electrólito SDS-PAGE

Tabela 6.4 Composição e preparação do tampão A

Tabela 6.5 Composição e preparação das soluções de fixação, lavagem, pré-tratamento, coloração, revelação e lavagem usadas na coloração por nitrato de prata

Tabela 6.6 Partição da proteína total e dos ligandos no SDFA 13% PEG8000-9,9% $(NH_4)_2SO_4$, com uma concentração de ligandos de 0,2 $mg.g^{-1}$

Tabela 6.7 Resultados obtidos para os ensaios à escala laboratorial utilizando o esquema proposto na Figura 6.8

Tabela 6.8 Resultados obtidos na extracção da enzima endo-PG utilizando o esquema de separação proposto na Figura 6.13

LISTA DE TABELAS
(CONTINUAÇÃO)

CAPÍTULO 7

Tabela 7.1 Efeito da temperatura nos coeficientes de partição da endo-PG e proteína total

Tabela 7.2 Resultados de separação da enzima endo-PG e proteína no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, ÍNDICES INFERIORES E LETRAS GREGAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Act.	Actividade
CPT	Ponto de turvação (sigla inglesa de "cloud point temperature")
DO	Densidade óptica
Dex	Dextrano
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
Endo-PG	Endo-poligalacturonase
EO	Óxido de etileno
EOPO	Óxido de etileno óxido de propileno
Esp.	Específica
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
K	Coeficiente de partição
k	quilo (10^3)
m	Massa
M	Massa molecular (kDa ou Da)
n.d.	Não disponível
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PE	Pectinesterase
PEG	Polietilenoglicol
PG	Poligalacturonase
PGL	Pectatoliase
pI	Ponto isoeléctrico
PL	Pectinaliase
PMG	Polimetilgalacturonase
PO	óxido de propileno
PR	Razão do volume de fases (sigla inglesa de "phase ratio")
PVA	Álcool polivinil
PES	Hidroxipropil amido

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, ÍNDICES INFERIORES E LETRAS GREGAS (CONTINUAÇÃO)

Recup.	Recuperação
rpm	Rotações por minuto
s	Desvio padrão
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio
STL	Declive da linha de ligação (sigla inglesa de "tie-line slope")
t	Tempo (min)
T	Temperatura (ºC)
TLL	Comprimento da linha de ligação (sigla inglesa de "tie-line lenght")
UV	Ultra-violeta
V	Volume
Vis	Vísivel
W	Concentração

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentagem mássica
(p/V)	Peso/volume
(p/p)	Peso/peso
(V/V)	Volume/volume
C	Carbono
N	Azoto
Q_{PG}	Produtividade em endo-PG
$Y_{(X/S)}$	Rendimento de conversão do substrato a biomassa
$\mathbf{Y_{(PG/S)}}$	Rendimento de conversão do substrato a enzima endo-PG

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, ÍNDICES INFERIORES E LETRAS GREGAS (CONTINUAÇÃO)

LISTA DE ÍNDICES INFERIORES

E	Enzima endo-PG
f	Final
i	Inferior
l	Ligando
lav	Lavagem
max	Máximo
p	Proteína
r	Retenção
s	Superior
0	Inicial

LISTA DE LETRAS GREGAS

μ	Taxa específica de crescimento
λ	Comprimento de onda (nm)

xx



Capítulo 1

Introdução

1	1	Introdução
3	1.1	Contexto e Motivação
4	1.2	Objectivos
5	1.3	Estrutura da Dissertação
7	1.4	Referências bibliográficas

Neste capítulo define-se o contexto e motivação do trabalho presente nesta dissertação, referindo-se, de seguida, os principais objectivos.

Por último descreve-se a estrutura da dissertação.

1.1 CONTEXTO E MOTIVAÇÃO

O desenvolvimento tecnológico atingiu, nas últimas décadas, dimensões incalculáveis e, dentro deste contexto, os processos biotecnológicos industriais merecem destaque especial. Tais processos apresentam significativa relevância social e económica, uma vez que, podem utilizar recursos naturais e gerar uma grande quantidade de biomoléculas de interesse industrial.

Um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial, em grande desenvolvimento, é a produção de enzimas. Estas quando produzidas pelas grandes indústrias do sector são, na maioria dos casos, de origem microbiana devido, principalmente, à maior diversidade que é possível obter a partir deste tipo de produção, e às dificuldades, operacionais e económicas, dos processos de extração de enzimas de tecidos animais e vegetais.

As pectinases são um grupo de enzimas de grande aplicação na indústria. A sua aplicação biotecnológica vai desde a grande utilização na indútria de processamento de frutos, na indústria têxtil, no provessamento de fibras das plantas, tratamento de efluentes industrais com material péctico (Jayani et al., 2005).

Estima-se que as pectinases representem cerca de 25 % das vendas mundiais de enzima. A maioria das preparações comerciais deste grupo de enzimas é produzida por fungos filamentosos (Singh et al., 1999). O fungo filamentoso mais utilizado para a produção industrial das pectinases é o *Aspergillus niger* (Barnby, 1987). A principal desvantagem associada à produção por este microrganismo reside no facto do mesmo, libertar outros metabolitos que dificultam as etapas de separação.

A produção de pectinases utilizando a estirpe *Kluyveromyces marxianus* tem atraído bastante interesse uma vez que cerca de 90 % das proteínas excretadas por este microrganismo são poligalacturonases (Barnby, 1987) e quando comparada com os fungos filamentosos, o crescimento da levedura e

consequente excreção de enzima, em cultura submersa e utilizando volumes elevados, é mais praticável.

A enzima endo-poligalacturonase pura é pretendida quando na indústria de processamento de frutos se pretende manter o carácter encorpado dos sumos, ou seja uma redução do tamanho da cadeia de pectina, sem redução da esterificação (Barnby, 1987).

Uma das técnicas mais usadas para a separação de biomoléculas é os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) (Albertsson, 1986). Nas últimas décadas, estes sistemas, têm sido objecto de intensa investigação. De facto, as suas características particulares, como proporcionarem um ambiente inócuo para a separação de biomoléculas, tratar-se de uma técnica com vantagens do ponto de vista económico, bem como a facilidade na passagem de escala piloto para escala industrial, confere-lhe um lugar de primazia nos processos de extracção, em particular na área da biotecnologia.

1.2 OBJECTIVOS

Dentro do contexto referido na secção anterior, o trabalho apresentado nesta dissertação teve como objectivo geral a purificação, por utilização dos SDFA, da enzima endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyveromyces marxianus*.

Para que o objectivo principal fosse alcançado, foram estabelecidos 3 objectivos específicos:

- Selecção das leveduras produtoras da enzima endo-PG.

  De entre um conjunto de estirpes de *Kluyveromyces marxianu*s isoladas da fermentação do cacau, seleccionar as melhores produtoras da enzima endo-poligalacturonase usando como substrato meios sintéticos de glucose e sacarose e também um resíduo industrial do processamento de açúcar, melaço de cana.

- Caracterização da enzima

  Realizar uma caracterização da enzima em termos de massa molecular.

  Determinar o teor de enzima em relação à proteína total, no sobrenadante de fermentação, com coluna de filtração em gel e de troca iónica.

  Avaliar a estabilidade da enzima a várias temperaturas.

- Purificação da enzima

  Determinar a partição da enzima em vários sistemas de duas fases aquosas, nomeadamente sistemas convencionais polímero-sal tais como PEG-$(NH_4)_2SO_4$, PEG-fosfato de potássio e outros considerados alternativos como PEG-Reppal PES100 e PEG-PVA.

  Determinar a partição da enzima utilizando SDFA construídos com polímeros termossensíveis tais como: Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, Ucon-PVA e Ucon-PES.

  Propor e testar esquemas de separação, tendo em vista a produção à escala industrial de enzima endo-PG.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em oito capítulos. Neste primeiro capítulo são introduzidos os principais temas do trabalho fazendo-se o respectivo enquadramento na área da biotecnologia.

No capítulo 2 faz-se a revisão bibliográfica sobre os principais temas deste trabalho. Assim, faz-se uma abordagem à produção e à caracterização da enzima endo-poligalacturonase, nomeadamente descreve-se a actuação da enzima sobre as pectinas, e faz-se uma caracterização da enzima.

De seguida, faz-se breve abordagem às várias tecnologias de purificação, dando-se especial destaque aos sistemas de duas fases aquosas. São descritos os diagramas que representam os SDFA, e discutem-se os principais factores que podem ser manipulados de forma a alterar o coeficiente de partição dos vários solutos. São também referidos os vários SDFA alternativos, nomeadamente os SDFA que utilizam polímeros termossensíveis.

No capítulo 3 encontram-se descritas as metodologias e equipamento utilizados na execução do trabalho experimental. Este capítulo encontra-se dividido em três secções principais: fermentações das estirpes *K. marxianus*, métodos analíticos e SDFA.

Os capítulos 4, 5, 6 e 7 dizem respeito aos vários resultados obtidos durante a execução deste trabalho. Assim, no capítulo 4 apresentam-se os resultados de selecção das melhores estirpes produtoras em termos de produção de enzima, utilizando meios com glucose e sacarose. De seguida, para uma das melhores estirpes produtoras estuda-se a influência das condições de aerobiose/anaerobiose em termos de produção de enzima. Neste capítulo faz-se também uma breve caracterização da enzima endo-PG em termos de massa molecular e em termos de estabilidade a diferentes temperaturas.

No capítulo 5 apresenta-se os resultados respeitantes a novos diagramas de fases foram determinados. Assim, apresentam-se os resultados para os sistemas Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, Ucon-PVA, Ucon-PES100 e PEG8000-PVA.

Nos capítulos 6 e 7 estuda-se a partição da enzima. No capítulo 6 são apresentados resultados em que a enzima é separada em SDFA constituidos por PEG-sal e PEG-PVA. São propostos esquemas de separação da enzima utilizando estes sistemas.

No capítulo 7 a partição da enzima faz-se em sistems termossensíveis, nomeadamente no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$.

Por último, no capítulo 8 são apresentadas as principais conclusões deste trabalho e indicadas algumas sugestões para o trabalho futuro.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertsson, P.A. Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses, and applications to biotechnology. Em: Walter, H., Brooks, D.E. e Fisher, D. (Eds.). Academic Press, Inc., Londres. 1985.

Barnby, F.M. An investigation of the pectinolytic system of *Kluyveromyces marxianus*. Universisty of Reading, United Kingdoom. PhD thesis. 1987.

Jayani, R. S., Saxena, S. e Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 40, 2931–2944. 2005.

Singh, S. A, Ramakrishna, M. e Rao, A. G. A. Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarious*. Process Biochemistry. 35, 411-417. 1999.



Capítulo 2

Revisão bibliográfica

9	2	Revisão Bibliográfica
11	2.1	Introdução
12	2.2	Produção e caracterização da endo-poligalacturonase
12	2.2.1	Pectinas
15	2.2.2	As enzimas pécticas
18	2.2.3	Produção e importância das enzimas pécticas
22	2.2.4	Endo-poligalacturonase
26	2.2.5	A levedura *Kluyveromyces marxianus* como produtora de endo-poligalacturonase
27	2.3	Técnicas de Purificação
27	2.3.1	Cromatografia
30	2.3.2	Sistemas de duas fases aquosas
31	2.3.3	Diagramas de fases
37	2.3.4	Partição em sistemas de duas fases aquosas
43	2.3.5	Aplicações dos sistemas de duas fases aquosas
46	2.3.6	Sistemas de duas fases aquosos alternativos
48	2.3.7	Sistemas de duas fases aquosas com polímeros termossensíveis
52	2.4	Referências Bibliográficas

O trabalho presente nesta dissertação é transversal a duas áreas de um processo biotecnológico: a produção, em biorreactor, de uma enzima, neste caso, a endo-poligalacturonase, e os processos de separação. Neste capítulo apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre estes dois temas.

Inicialmente é feita uma abordagem às pectinas e as respectivas enzimas pécticas, referindo-se à produção e importância destas últimas. De seguida é realizada uma caracterização à enzima endo-poligalacturonase produzida por diversos organismos e por último a relevância da produção da referida enzima pelo género *Kluyveromyces marxianus*.

Em relação ao segundo tema faz-se uma introdução às técnicas de purificação dando-se especial destaque à partição bifásica aquosa. Sobre este processo de separação apresenta-se uma revisão sobre o diagrama de fases e a influência de algumas características na partição de biomoléculas. São enumeradas as aplicações dos sistemas de duas fases aquosas, polímeros e sais convencionais e alternativos utilizados, assim como se introduz a temática sobre polímeros termossensíveis.

2.1 INTRODUÇÃO

As pectinases são um grupo de enzimas que degradam as pectinas e são muito usadas na indústria alimentar para aumentar o carácter encorpado dos sumos de fruta, assim como para promover a clarificação e extracção dos mesmos sumos. As enzimas pécticas são comercializadas como misturas complexas de endo-poligalacturonase, exo-poligalacturonase, pectinaliase e pectinesterase.

À escala industrial, as pectinases são obtidas a partir da fermentação de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*. Contudo, para além destas enzimas são produzidas outras, assim como metabolitos que conferem uma grande complexidade à solução, conduzindo a maiores dificuldades técnicas e financeiras no processo de separação.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta-se como uma alternativa à produção das pectinases. Para além de ser considerado um microrganismo GRAS, a maioria das enzimas produzidas por esta levedura são poligalacturonases, dando origem a misturas menos complexas.

Nas situações em que é necessária uma degradação completa da pectina, deverá ser utilizada uma preparação de enzima contendo todas as enzimas pécticas, incluindo a pectinesterase. Assim, deverá ser utilizada uma preparação obtida a partir de *Aspergillus niger*. Contudo, quando o carácter encorpado é pretendido (isto é, é necessário que se mantenha pectina em suspensão) é necessário uma redução no comprimento da cadeia mas não no grau de esterificação. Neste caso, é necessário uma preparação livre de pectinesterase. Outra vantagem associada à utilização de preparações sem pectinesterase é a não produção de metanol. Para estas situações deverá ser utilizada uma preparação obtida por fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Após a obtenção da preparação a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* torna-se necessário desenvolver processos para a sua purificação. A utilização de sistemas de duas fases aquosos tem sido referida como um processo adequado para purificação de enzimas, uma vez que permite obter rendimentos elevados em tempos curtos e com custos baixos. Contudo, existe pouca informação sobre a aplicação deste processo na purificação da enzima endo-poligalacturonase.

2.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENDO-POLIGALACTURONASE

2.2.1 Pectinas

As substâncias pécticas são um grupo complexo de polissacarídeos carregados negativamente, acidificados, presentes em grandes quantidades nos tecidos das plantas superiores, no espaço intercelular, sob a forma de pectato de cálcio ou pectato de magnésio.

As substâncias pécticas são cerca de 0,5 % a 4,0 % do peso das plantas (Sakai et al., 1993).

Tabela 2.1 Percentagem das pectinas em diferentes frutos e vegetais (Jayani et al, 2005)

Fruto/vegetal	Tecido	Substâncias pécticas (%)
Maçã	Fresco	0,5 - 1,6
Banana	Fresco	0,7 - 1,2
Pêssego	Fresco	0,1 – 0,9
Morango	Fresco	0,6 – 0,7
Cereja	Fresco	0,2 – 0,5
Ervilha	Fresco	0,9 – 1,4
Cenouras	Matéria seca	6,9 – 18,6
Polpa laranja	Matéria seca	12,4 – 28,0
Batatas	Matéria seca	1,8 – 3,3
Tomate	Matéria seca	2,4 – 4,6
Açúcar da polpa beterraba	Matéria seca	10,0 – 30,0

Sendo polissacarídeos, as substâncias pécticas contrariamente às proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, não possuem uma massa molecular definida. As massas moleculares das substâncias pécticas variam de 25 até 360 kDa, conforme apresentado na Tabela 2.2, (Sakai et al., 1993).

Tabela 2.2 Massas moleculares de substâncias pécticas, provenientes de diferentes fontes (adaptado de Sakai et al., 1993)

Fonte	Massa molecular (kDa)
Maçã e limão	200 – 360
Pêra	25 – 35
Laranja	40 – 50
Açúcar polpa beterraba	40 - 50

O comité da "American Society" definiu este conjunto de substâncias pécticas da seguinte forma:

- Substâncias pécticas – é a designação usada para os hidratos de carbono complexos coloidais que podem aparecer nas plantas ou preparados a partir delas e que contêm um elevado número de unidades de ácido galacturónico. Os grupos carboxilo dos ácidos podem estar parcialmente esterificados por grupos metilo ou parcialmente ou totalmente neutralizados por uma ou mais bases.

- Protopectina – designação atribuída a substâncias percursoras das substâncias pécticas que apresentam como característica a insolubilidade na água. A protopectina quando hidrolisada gera pectina ou ácidos pécticos.

- Ácido péctico – é o polímero solúvel de ácido galacturónico que contém uma quantidade negligenciável de grupos metilo. Os sais destes ácidos denominam-se pectatos.

- Ácidos pectínicos - termo usado para designar o ácido poligalacturónico coloidal que contém uma quantidade significativa de grupos metilo esterificados (> 0 e < 75%). Os sais destes ácidos denominam-se pectinatos.

- Pectina – nome dado ao material polimérico no qual, pelo menos 75 % dos grupos carboxilo do ácido galacturónico são esterificados com metanol. Confere rigidez à parede celular quando está ligado à celulose.

As pectinas e o ácido péctico, que são os substratos naturais das enzimas pécticas, consistem num grupo de hidratos de carbono complexos que contêm ligações α-1,4 de ácido D-galacturónico, parcialmente esterificados com o grupo metilo (Kertesz, 1951). Muitas vezes são encontrados, ligados à cadeia de ácido galacturónico os seguintes açúcares: L-ramnose, L-arabinose, D-galactose, D-xilose (Keenan et al., 1985). Estes açúcares estão associados com o ácido galacturónico como ramificações da cadeia principal ou então incorporados na cadeia principal de unidades de ácidos galacturónicos (De Vries et al., 1983). Os açúcares associados ao ácido galacturónico actuam como agente desidratante e diminuem a solubilidade da pectina. Por outro lado, pectinas com elevado grau de metilação ou esterificação são menos solúveis em água do que pectinas com baixo grau de metilação ou esterificação.

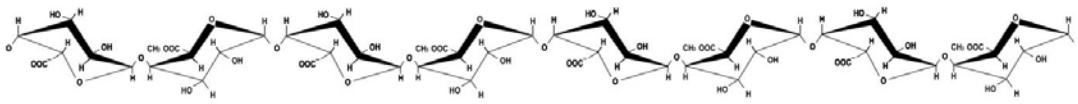


Figura 2.1 Estrutura primária das substâncias pécticas. A cadeia primária consiste em unidades de ácido α-D-galacturónico com ligação α-(1→4) com 2-4 % de unidades de ramnose com ligações β-(1→2) e β-(1→4) às unidades de ácido galacturónco (Whitaker, 1990).

As pectinas podem ser encontradas nas paredes das células das plantas e também em alguns sucos de plantas (Goodwin and Mercer, 1980). São também usadas na indústria alimentar como agentes gelificantes para a produção de geleias e conservantes.

2.2.2 As enzimas pécticas

As pectinas são degradadas por várias enzimas, que podem ser classificadas em três grupos (Sakai, 1992; Palomaki e Saarilahti, 1997):

- protopectinases – degradam a protopectina insolúvel dando origem a uma elevada quantidade de pectina solúvel.
- esterases – catalisam a de-esterificação, removem o grupo metilo do ácido esterificado;
- despolimerases – que quebram as ligações glicosídicas α-1,4 das unidades de ácido poligalacturónico.

As despolimerases actuam nas substâncias pécticas por dois mecanismos (Albersheim et al., 1960; Codner, 2001):

- hidrólise – as enzimas catalizam o rompimento hidrolítico, com a introdução de água através de pontes de oxigénio
- transeliminação – em que as enzimas rompem a ligação sem a participação de nenhuma molécula de água.

As despolimerases podem ser, ainda, divididas em 4 categorias dependendo da preferência da enzima para o substrato, do mecanismo de rompimento da ligação, e da intensidade da ligação glicosídica (Rexová-Benková e Markovic, 1976).

As poligalacturonases (PG) e polimetilgalacturonases (PMG) rompem o ácido péctico e a pectina por mecanismos de hidrólise. A pectatoliase e a pectinaliase rompem o pectato e a pectina por β-eliminação, respectivamente. Dependendo da localização da actuação da enzima (aleatoriamente ou nos extremos), as enzimas podem classificar-se em endo ou exo, respectivamente.

Uma classificação mais recente e completa pode ser encontrada na Tabela 2.3.

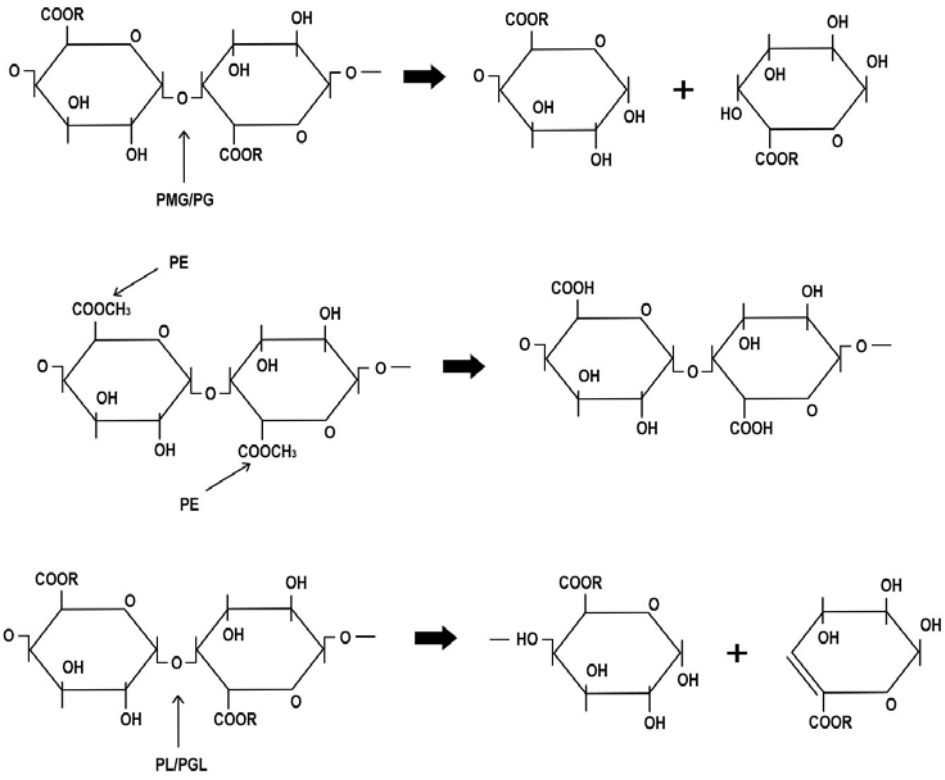


Figura 2.2 Reacções catalisadas pelos diferentes tipos de enzima sobre a pectina ou o ácido péctico.

Tabela 2.3 Classificação extensiva das enzimas pécticas (adaptado de Jayani et al., 2005)

Enzima	Nº. E.C.	Mecanismo acção	Actuação	Substrato primário	Produtos
Esterases					
Pectinesterase (PE)	3.1.1.11	Hidrólise	Aleatória	Pectina	Ácido péctico, metanol
Despolimerases – Hidrolases					
Protopectinases		Hidrólise	Aleatória	Protopectina	Pectina
Endo-poligalacturonase (PG)	3.2.1.15	Hidrólise	Aleatória	Ácido péctico	Oligogalacturonatos
Exo-poligalacturonase (PG)	3.2.1.67	Hidrólise	Terminal	Ácido péctico	Monogalacturonatos
Endo-polimetilgalacturonase (PMG)		Hidrólise	Aleatória	Pectinas altamente esterificadas	Oligometilgalacturonatos
Exo-polimetilgalacturonase (PMG)		Hidrólise	Terminal	Pectinas altamente esterificadas	Oligogalacturonatos
Despolimerases – Liases					
Endo-pectatoliase (PGL)	4.2.2.2	Transeliminação	Aleatória	Ácido péctico	Oligogalacturonatos insaturados
Exo-pectatoliase (PGL)	4.2.2.9	Transeliminação	Penúltima ligação	Ácido Péctico	Digalacturonatos insaturados
Endo-pectinaliase (PL)	4.2.2.10	Transeliminação	Aleatória	Pectinas	Metiloligogalacturonatos insaturados
Exo-pectinaliase (PL)		Transeliminação	Terminal	Pectinas	Metilomonogalacturonatos insaturados

2.2.3 Produção e importância das enzimas pécticas

As enzimas pécticas são produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* e por bactérias do género *Bacillus, Clostridium, Pseudomonas, Xanthomonas e Erwinia*, mas poucas leveduras, como, por exemplo, *Saccharomyces, Kluyveromyces, Cryptococci e Rhodotorula*, conseguem evidenciar actividade pectinolítica.

Actualmente, a maioria das preparações comerciais das enzimas são obtidas a partir dos fungos, nomeadamente, espécies do género *Aspergillus* como *A. niger, A. oryzae, A. wentii*. As preparações obtidas a partir deste género de fungo contêm pectinaliase, pectinesterase, exo e endo-poligalacturonase (Kester e Visser, 1990). Outras preparações contêm também α-amilase, proteases e celulases.

A actividade enzimática encontrada nas preparações obtidas a partir das leveduras referidas anteriormente não é tão elevada como a encontrada nas preparações obtidas a partir de fungos filamentosos e de bactérias. De entre todas as leveduras a que apresenta maior produção é *K. wickerhamii* seguida da espécie *K. marxianus*. (Silva et al., 2005b).

Foram já realizados vários trabalhos para detecção da actividade péctica em vários microrganismos isolados de diferentes fontes.

Souza e colaboradores (2003) trabalharam com 46 estirpes de fungos isoladas do solo e do cacau tendo como objectivo a pesquisa de actividade péctica. Todas as estirpes apresentavam capacidade para produzir pectinases. A melhor estirpe produtora foi *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1, cultivada a 30 ºC, em cultura submersa e em cultura em estado sólido, para a produção da endo-poligalacturonase. Verificou-se que a cultura em estado sólido apresentava melhores resultados que em cultura submersa; contudo quando tentaram fazer o aumento de escala a produção da enzima diminui.

Fernández-González e colaboradores (2004) avaliaram a presença de actividade da endo-poligalacturonase em 60 estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes do vinho. 36 destas estirpes possuíam a capacidade para degradar o ácido poligalacturónico.

Silva e colaboradores (2005b) isolaram 300 leveduras de frutos tropicais e avaliaram a produção de pectinases. As estirpes produtoras pertenciam a 6 géneros diferentes de leveduras. 21 estirpes possuíam a capacidade de produzir poligalacturonase e 7 delas produziam também a pectinaliase. 9 estirpes eram capazes de produzir a enzima pectinesterase. Uma estirpe de *Kluyveromyces wickerhamii* excretava a maior quantidade de poligalacturonase, seguida por uma estirpe de *K. marxianus* e *Stephanoascus smithiae*.

A produção das enzimas pécticas tem sido realizada essencialmente por duas formas: fermentação em estado sólido e fermentação em estado líquido.

Kashyap e colaboradores (2003) tentaram aumentar a produção de pectinases utilizando a fermentação em estado sólido pelo *Bacillus* sp. DT7. A actividade máxima da enzima foi obtida com o meio constituído por farelo de trigo, suplementado com ácido poligalacturónico (0,1 % p/V) e com um aditivo vitamínico, após incubação a 37 ºC, durante 36 h.

Silva e colaboradores (2005a) produziram endo-PG e exo-PG por fermentação em matriz sólida utilizando a estirpe *Penicillium viridicatum* RFC3.

Bai e colaboradores (2004) produziram pectinases utilizando o fungo *Aspergillus niger*. A fonte de carbono utilizada foi o açúcar da polpa de beterraba, a fonte de azoto e água foi o efluente líquido da produção de glutamato de sódio.

Botella e colaboradores (2005) produziram pectinases, celulases e xylanases, utilizando um resíduo agro-industrial como fonte de carbono, com uma estirpe de *Aspergillus awamori*. Os resultados evidenciaram que o resíduo usado é uma alternativa competitiva para a produção das enzimas.

A produção da enzima endo-poligalacturonase, em contínuo, apresenta-se também como uma solução (Almeida et al., 2003; 2005). Foram utilizados dois

tipos de reactor: reactor contínuo perfeitamente agitado e reactor de leito empacotado. A estirpe utilizada foi a *K. marxianus* CCT 3172. Os resultados encontrados apontam maiores produtividades no reactor de leito empacotado que, por sua vez, são cerca de 10 vezes superiores aos obtidos numa cultura descontínua sem arejamento.

A selecção das condições óptimas de fermentação para a produção de enzimas pécticas, assim como a selecção das condições óptimas de actuação dessas mesmas enzimas tem sido alvo de estudos recorrendo à optimização factorial. Assim, Moyo et al. (2003) optimizou as condições de fermentação para produção de enzimas pécticas, usando uma estirpe de *Kluyveromyces wickerhamii* isolada de fruta apodrecida, utilizando a metodologia da resposta por superfície. As condições a optimizar foram pH, temperatura e período de incubação. O efeito dos dois primeiros factores mostrou-se mais significativo em termos de produção da enzima. As condições obtidas foram: pH=5,0; temperatura=32ºC e um período de incubação de 91 horas. Somente foi encontrada actividade referente à enzima poligalacturonase e referiram que a enzima era parcialmente constitutiva.

Sharma e Satyanarayana (2005) usaram a optimização factorial para produção de pectinases, utilizando a estirpe *Bacillus pumilus*. As variáveis utilizadas para optimização foram a razão C:N, concentração de K_2HPO_4, e o pH. Após a optimização, conseguiram um incremento de 34 e 41 vezes na produção da enzima, usando frascos e reactores, respectivamente. A enzima obtida foi testada na indústria de processamento de fibras, para redução do peso das mesmas.

Estudos de optimização factorial foram também efectuados para optimizar a clarificação enzimática de sumos de banana utilizando pectinases (Lee et al., 2006). Verificou-se que, aumentando o tempo e/ou concentração da enzima, havia uma maior facilidade em termos de filtração e clarificação, assim como um decréscimo na turbidez e viscosidade. As condições óptimas encontradas foram: 0,084 % de concentração de enzima, 43,2 ºC de temperatura de incubação e um tempo de incubação de 80 minutos.

Muitas bactérias e fungos, que são patogénicos para as plantas, produzem pectinases e celulases para macerar o tecido do hospedeiro, sendo esta a primeira acção no processo de invasão das plantas (Bateman and Basham, 1976; Byrde, 1982).

Existem, contudo outras situações, em que as enzimas pécticas são benéficas para o processo em questão. Por exemplo, na fermentação natural dos grãos de cacau (Sanchez et al., 1984) ou do café, as enzimas actuam no sentido de remover o material péctico que envolve os grãos. No processamento de sumos de fruta, as enzimas têm um papel crucial na extracção e clarificação do sumo e também na redução da viscosidade dos sumos.

Blanco et al. (1997) evidenciaram que o tempo de filtração de sumos reduz para cerca de 50 % quando são usadas enzimas pécticas.

Yu e Lencki (2004) verificaram que a utilização das enzimas poligalacturonase e pectinaliase, na microfiltração de sumos de maçã, aumentava as interacções coloidais, conduzindo a uma maior densidade dos aglomerados e, consequentemente, a uma maior porosidade no leito retido no filtro. Este facto conduzia a maiores fluxos de permeado e menores tempos de filtração. Por outro lado, a utilização da pectinesterase conduzia a repulsões dos agregados, diminuindo os fluxos de permeado. Contudo, menores resistências do bolo eram obtidas combinando as 3 enzimas, uma vez que se criava um gel com macro e microporosidade.

Kaur et al. (2004) verificaram um aumento do rendimento na extracção de sumo de banana, uva e maçã quando a polpa dos frutos era tratada com uma mistura de enzimas compostas por pectinases, xilanases e celulases. Vaillant et al. (1999) verificaram, também, que a mistura entre pectinases e celulases aumentava o fluxo de permeado na microfiltração de sumos de maracujá.

Busto et al. (2005) usaram a pectinaliase livre e imobilizada para tratamento dos sumos de fruta. Em ambos os casos verificou-se a redução da viscosidade da solução conferida por pectinas altamente esterificadas. A vantagem da

utilização da enzima imobilizada consistia no facto desta poder ser usada em 4 ciclos com perdas na redução da enzima de, somente, cerca de 10 %.

Outra das aplicações na indústria de processamento de frutos é a utilização de infusões de enzimas para remoção da pele de citrinos (Baker e Wicker, 1996).

2.2.4 Endo-poligalacturonase

A enzima endo-poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) é a enzima péctica que cataliza a hidrólise da cadeia do ácido poligalacturónico, com a introdução de uma molécula de água (Tabela 2.3).

As endo-poligalacturonases são produzidas por fungos filamentosos, bactérias e algumas leveduras (Luh e Phaff, 1951). A caracterização desta enzima produzida por vários microrganismos já foi efectuada, como se pode ver na Tabela 2.4.

Uma das aplicações das enzimas pécticas, como referido anteriormente, é na indústria de processamento de frutos, para a extracção e clarificação dos sumos, assim como para a redução da viscosidade sem perda do carácter encorpado dos mesmos (Barnby, 1987).

Na primeira situação, uma preparação de enzimas que contenha pectinesterase é a mais eficiente. Contudo, quando o carácter encorpado é necessário, uma preparação que contenha somente endo-poligalacturonase permite obter melhores resultados.

Tabela 2.4 Endo-poligalacturonases que foram purificadas e caracterizadas provenientes de várias fontes. Massa molecular (M); Ponto isoeléctrico (pI); pH e temperatura (T) óptimos para actuação da enzima

Fonte endo-PG	M (kDa)	pI	K_m	T óptima (ºC)	pH óptimo	T estabilidade	pH estabilidade	Referência
A.japonicus	PG I – 38	5,6	-	30	4,0 – 5,5	-	-	Hasunuma et al., 2003
	PG II - 65	3,3	-	30	4,0 -5,5	-	-	
A. niger	PG I – 61	-	0,12	43	3,8 – 4,3	50	-	Singh e Rao, 2002
	PG II - 38	-	0,72	45	3,0 – 4,6	51	-	
A. niger	PG I -35	-	-	-	4,1	-	-	Cooke et al., 1976
	PG II - 85	-	-	-	3,8	-	-	
A. niger	PG I – 38	3,3					4,0 – 5,0	Kester e Visser, 1990
	PG II - 59	5,9					4,0 – 5,0	
A. niger	PG I – 29,5	5,2-5,4					2,8 – 5,1	Harsa, 1991
	PG II – 94,5	5,2-5,4					2,8 – 5,1	
A. awamori	41	6,1	-	40	5,0	50	4,0 – 6,0	Nagai et al., 2000
A. awamori								Blandino et al., 2001
Phanerochaete chrysosporium	41,7	4,3 – 4,6		66	4,7			Shanley et al., 1993
Sporotrichum thermophile				55	7,0			Kaur et al., 2004

Fonte endo-PG	M (kDa)	pI	K_m	T óptima (ºC)	pH óptimo	T estabilidade	pH estabilidade	Referência
S. cerevisiae	43	-	-	45	4,5	-	-	Blanco et al., 1999
S. cerevisiae	42			25			3,0 – 5,5	Gainvors et al., 2000
S. cerevisiae	39		4,7	45	5,5	50	4,5 – 6,0	Corredig et al., 2000
S. cerevisiae var. chevalieri				30	4,5			Schwan et al., 1997
K. wickerhamii				35	4,5			Silva et al., 2005b
K. marxianus	PG I – 49,6	6,3						Barnby et al., 1990
	PG II – 49,6	6,0						
	PG III – 46,7	6,3						
	PG IV – 49,6	5,7						
K. marxianus	PG I – 47			40	5,0		4 - 6	Schwan et al., 1997
	PG II – 41						4 – 6	
	PG III – 35						4 – 6	
	PG IV - 33						4 - 6	
K. marxianus				35	5,5		4 -6	Silva et al., 2005b
K. marxianus	33			40	4,5			Presente trabalho

Tabela 2.4 (continuação)

2.2.5 A levedura *Kluyveromyces marxianus* como produtora de endo-poligalacturonase

A *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura anteriormente designada por *K. fragilis* ou *S. fragilis* (Rose e Harrison, 1969). Luh and Phaff (1951) identificaram que a *K. marxianus* conseguia produzir constitutivamente uma enzima péctica que correspondia à endo-poligalacturonase. A enzima possuía um pH e temperatura óptimos de actuação de 4,4 e entre 50-55 ºC, respectivamente. A enzima era produzida em maiores quantidades em culturas agitadas com arejamento do que em culturas sem agitação, onde a transferência de oxigénio era limitada (Luh and Phaff, 1951, 1954a; Phaff and Demain, 1956).

Wimborne e Rickard (1978) testaram cerca de 30 estirpes em relação à sua actividade pectinolítica. Deste teste seleccionaram a estirpe *Saccharomyces fragilis* (actualmente, *K. marxianus*) isolada da pele das uvas. Foi só encontrada actividade para a endo-poligalacturonase. Quando a estirpe crescia em condições controladas de oxigénio (cerca de 60 %), verificou-se que não existia actividade, mas quando se mantinham condições estritamente anaeróbias por injecção de dióxido de carbono ou azoto, encontrou-se endo-poligalacturonase no sobrenadante da fermentação. Este resultado é contrário ao publicado por Luh e Phaff (1951), em que o oxigénio não interferia com a produção de enzima.

Outro resultado também encontrado foi que, na presença do substrato pectina havia um incremento na excreção da enzima, considerando-se assim uma enzima parcialmente constitutiva. Luh e Phaff (1951) e Schwan e Rose (1994) chegaram a resultados contrários a este. Este resultado é apresentado baseado na redução da viscosidade de uma solução de pectina, contudo não é estabelecida nenhuma relação linear entre a redução da viscosidade e a actividade enzimática nem são apresentados intervalos de confiança para os resultados apresentados.

Garcia-Garibay et al. (1987) mostraram que a produção de proteína celular e endo-PG a partir da cultura de *K. fragilis*, utilizando soro como substrato, era praticável e também foi considerado um processo atractivo para utilização na indústria.

Gomez-Ruiz et al. (1988) produziram endo-PG, utilizando a estirpe *K. fragilis* com soro de queijo como substrato e compararam com uma enzima comercial. Verificaram que não existe diferença significativa no poder de clarificação de sumos quando se usava a enzima parcialmente purificada de *K. fragilis* quando comparada com a enzima comercial obtida a partir de fungos filamentosos. Mostraram, também, que a enzima produzida podia ser usada na preparação de concentrados de fruta e na extracção de óleos.

Schwan e Rose (1994) verificaram que duas estirpes de *K. marxianus,* isoladas da fermentação do cacau, eram capazes de produzir a enzima endo-poligalacturonase em condições de anaerobiose induzida, de acordo também com os resultados obtidos por Wimborne e Rickard (1978). A produção da enzima ocorria somente durante o crescimento celular e não se encontrava mais excreção após entrar na fase estacionária. Não encontraram actividade nem para a pectinesterase, nem para a pectatoliase. O efeito da composição do meio também foi verificado. A substituição da fonte de carbono glucose por sacarose não conduzia a nenhuma alteração em termos de excreção da enzima e de produção de etanol. Contudo, quando a substituição era feita por frutose verifica-se um atraso na produção de endo-PG e de etanol, não interferindo com o crescimento. O substrato que conduzia a maior produção de enzima era a glucose. Verificaram também, e de acordo com Luh e Phaff (1951, 1954a) e contrariamente a Wimborne e Rickard (1978) que a adição de pectina ou ácido péctico não incrementava a excreção de endo-PG, sendo portanto, uma enzima constitutiva.

2.3 TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO

Produtos de alto valor acrescentado tais como aminoácidos, péptidos e proteínas têm de ser produzidos em elevados graus de pureza.

Após a produção da enzima é necessária a sua purificação. Na literatura existem várias técnicas utilizadas para a sua purificação e também caracterização.

Nas secções seguintes faz-se uma revisão às técnicas utilizadas: cromatografia, e partição bifásica aquosa. É dado especial ênfase a esta última técnica, uma vez que foi a técnica utilizada neste trabalho.

2.3.1 Cromatografia

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas para a separação de biomoléculas.

A cromatografia consiste na passagem de solutos, arrastados por uma fase móvel, através de colunas preenchidas com uma fase estacionária. As interacções entre os solutos e a fase estacionária permitem a separação, conforme Tabela 2.5.

Existem 4 tipos diferentes de interacção entre a fase móvel e a estacionária: adsorção, afinidade, troca iónica e filtração em gel.

Tabela 2.5 Alguns métodos cromatográficos, princípio de operação e característica que permite a separação

Método cromatográfico	Principio de operação	Característica para separação
Adsorção	Ligações de Van der Walls na superfície	Polaridade
Afinidade	Formação de complexos específicos	Estrutura macromolecular
Troca iónica	Ligações iónicas	Carga das moléculas
Gel	Difusão através dos poros	Tamanho da molécula

A cromatografia por adsorção baseia-se nas propriedades que certas substâncias, quer orgânicas (carvão activado ou polímeros sintéticos) quer inorgânicas (alumina, silicatos), têm para adsorver proteínas e outras substâncias de baixa polaridade por intermédio de forças de Van der Walls.

Segundo Vermeulen et al. (1973) a cromatografia por adsorção é usada com sucesso em:

- Descoloração, secagem de produtos de petróleo;
- Remoção de cor, sabor e odor de águas para abastecimento aos consumidores;
- Descoloração de óleos vegetais;
- Clarificação da cerveja e preparações farmacêuticas;
- Descoloração de xaropes de açúcar;
- Recuperação de vitaminas e outros produtos de misturas de fermentação.

A cromatografia por afinidade é muito usada para a purificação de enzimas e proteínas. Esta técnica é muito selectiva, especialmente quando é usado um

ligando. Contudo, os ligandos são caros, difíceis de preparar, têm um tempo de vida reduzido e uma capacidade de adsorção relativamente baixa quando comparados com as resinas de troca iónica.

A cromatografia por filtração em gel baseia-se no retardamento dos produtos pela passagem através de uma matriz porosa.

A cromatografia por troca iónica é uma técnica poderosa, versátil e oferece grande capacidade comparativamente com as outras técnicas de cromatografia (Harsa, 1991). Esta técnica é usada para recuperação de metais, para remoção de açúcares e aminoácidos de forma a purificar a água, assim como para tratamento de alguns efluentes industriais como soro de queijo, efluentes da indústria de batatas, efluentes de destilação.

A purificação de proteínas é também possível. As características a considerar para a separação de proteínas são: carga superficial das moléculas, densidade de carga e o tamanho molecular das proteínas, assim como o pH e a força iónica para promover a desorção (Venâncio, 1996). As proteínas ligam-se às matrizes de troca iónica de acordo com a carga e pH. A ligação ocorre devido a forças electrostáticas entre as cargas opostas do ligando e da proteína.

A cromatografia por troca iónica consiste em duas etapas principais: a etapa de adsorção e a etapa de desorção.

Na etapa de adsorção, após o equilíbrio da matriz com um tampão ao pH e força iónica desejados, é aplicada a amostra. Nesta altura, os iões da matriz são trocados com os solutos desejados da amostra. A adsorção é obtida uma vez que as proteínas possuem diferentes afinidades para a matriz de troca iónica devido às diferenças existentes nas cargas. De forma a maximizar a capacidade de adsorção da matriz dever-se-á optimizar as condições do processo: temperatura e pressão e também as variáveis químicas como pH e força iónica.

O objectivo da etapa de desorção é remover a proteínas adsorvidas de forma purificada. Isto é conseguido mudando o pH ou a força iónica do tampão de

eluição. A desorção permite obter as proteínas desejadas concentradas num curto período de tempo.

Existem dois processos para a desorção. Quando a eluição é feita com um tampão de composição igual ao tampão que foi usado para equilibrar a coluna, o processo denomina-se "eluição isocrática"; quando a eluição é efectuada com um tampão diferente é chamada de "eluição não-isocrática". Ambos os métodos podem ser adoptados para a eluição de proteínas.

2.3.2 Sistemas de duas fases aquosas

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) ocorrem quando se dissolvem, num meio aquoso, dois componentes imiscíveis. Os SDFA foram pela primeira vez estudados no final do século XIX quando Beijernick descobriu que uma mistura de gelatina e agar podia formar duas fases (Beijernick, 1896). 60 anos mais tarde, Albertsson e sua equipa voltaram a investigar e a estudar os SDFA, e desenvolveram várias aplicações no campo da separação (Albertsson, 1956). Desde então, vários investigadores basearam o seu trabalho no estudo e aplicabilidade dos SDFA. Até este momento existem duas classes de SDFA:

- constituídos por dois polímeros (polímero-polímero),
- constituídos por um polímero e um sal (polímero-sal).

Nestes tipos de sistemas começaram a ser introduzidos os denominados polímeros termossensíveis.

Os sistemas mais estudados são os compostos por polietileno glicol (PEG) e dextrano (Dex), ou por PEG e fosfato de potássio (Huddleston et al., 1991). Tal como foi evidenciado por Albertsson (1986), para concentrações além das definidas para uma zona de transição, formar-se-ão duas fases líquidas, predominando cada um dos componentes numa ou na outra fase. As fases são designadas "aquosas" devido à predominância de água na sua constituição. As composições das fases de equilíbrio podem variar por manipulação de diversos

factores como a temperatura, massa molecular dos polímeros e adição de sais aos sistemas.

Quando se adiciona um soluto a um SDFA, este distribui-se entre as fases em equilíbrio, e este fenómeno pode ser quantificado pelo coeficiente de partição, K, geralmente definido como o quociente entre a concentração do soluto na fase superior e a concentração do mesmo na fase inferior.

Alguns investigadores sugeriram que a extracção líquido-líquido em SDFA, para além de proporcionar um ambiente inócuo para a purificação de biomateriais (Albertsson, 1986; Hustedt et al., 1985), é uma técnica económica que permite o uso directo da tecnologia de engenharia química disponível para a separação à escala industrial. Nas últimas décadas esta metodologia tem encontrado uma crescente aplicação industrial. A título de exemplo referira-se que, a extracção por duas fases aquosas tem sido aplicada com sucesso à purificação de células animais e vegetais, vírus, proteínas e ácidos nucleicos. Recentemente, tem ganho atenção como método de separação de materiais inorgânicos (Zaslavsky, 1995). As principais vantagens que têm contribuído para o interesse crescente desta técnica, incluem o facto de proporcionarem ambientes suaves para o tratamento de materiais biológicos, a sua capacidade de oferecer bons factores de resolução e elevados rendimentos em actividade, bem como a facilidade na passagem de escala piloto para escala industrial (Diamond e Hsu, 1990). Todavia, o elevado custo dos polímeros tradicionalmente utilizados na separação de fases, constitui um dos principais obstáculos ao recurso a esta técnica de extracção. Este aspecto tem sido alvo de estudo e encontram-se na literatura vários sistemas alternativos (Tjerneld et al., 1986; presente trabalho), abordados mais em detalhe na secção 2.3.6.

2.3.3 Diagramas de fases

Os componentes de um SDFA podem ser, como referido anteriormente, dois polímeros diferentes (por exemplo: PEG e dextrano) ou um polímero e um soluto de baixa massa molecular (um sal, como por exemplo o fosfato de

potássio). Na mistura destas substâncias com a água, só irá ocorrer um sistema de duas fases, quando a composição dos constituintes se encontrar acima de determinados valores. A Figura 2.3 ilustra um digrama de fases genérico constituído por um polímero e um sal ou por dois polímeros. Geralmente, o constituinte representado no eixo das abcissas é o que possui maior concentração na fase inferior.

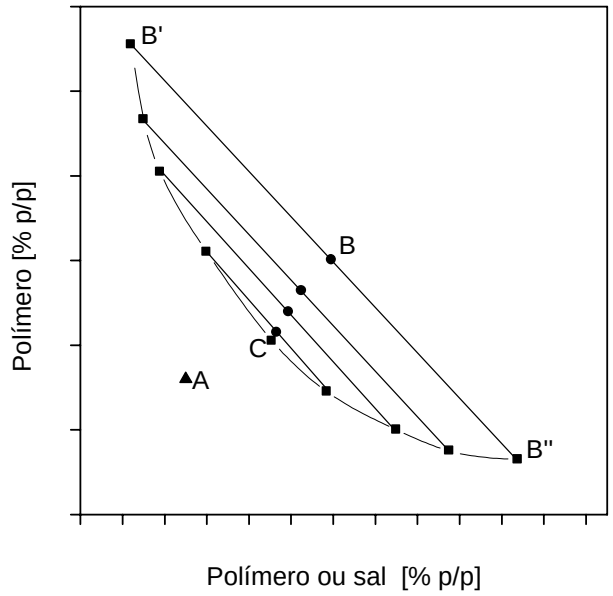


Figura 2.3 Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas. Binodal (–■–), linha de ligação (–●–), região de uma fase (A), região de duas fases e composição total do sistema (B), sendo B' e B'' as composições das fases superior e inferior do sistema e ponto crítico (C).

O diagrama de fases é constituído por uma linha convexa que separa a zona em que os componentes se misturam (região de um fase), ponto A, e a zona em que os componentes se tornam imiscíveis (região de duas fases), ponto B, que se denomina por binodal; e por várias outras linhas que se denominam por linhas de ligação e que representam as várias composições totais do sistema (B)

e cujas extremidades (nodos) representam a composição das fases superior e inferior (B' e B'', respectivamente). Qualquer composição total representada por pontos da mesma linha de ligação dá origem a sistemas de duas fases aquosas com as mesmas composições de equilíbrio, mas com diferentes quantidades de fases (Figura 2.4). Faz também parte do diagrama de fases o chamado ponto crítico (C). No ponto crítico as composições e os volumes das duas fases são teoricamente iguais.

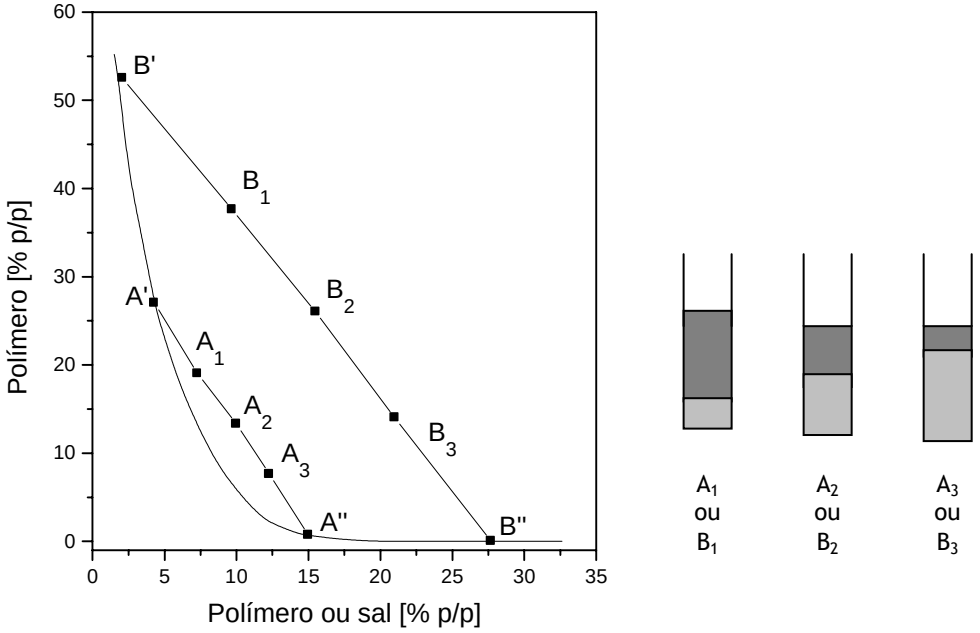


Figura 2.4 Composições totais (A_1, A_2, A_3 e B_1, B_2, B_3) e respectivas composições das fases superior e inferior em equilíbrio (A', A'' e B', B'').

A linha de ligação, como foi referido, descreve a composição das duas fases em equilíbrio e é caracterizada por dois parâmetros:

- comprimento da linha de ligação (TLL, sigla inglesa de "tie-line length")
- declive da linha de ligação (STL, sigla inglesa de "tie-line slope")

O comprimento da linha de ligação é definido como:

$$TLL(\%) = \sqrt{\left(W_{s,1} - W_{i,1}\right)^2 + \left(W_{s,2} - W_{i,2}\right)^2} \qquad \text{Equação 2.1}$$

onde $W_{s,j}$, $W_{i,j}$ representam a percentagem do componente j na fase superior e inferior, respectivamente.

O declive da linha de ligação é definido de acordo com a Equação 2.2

$$STL = \frac{W_{s,1} - W_{i,1}}{W_{s,2} - W_{i,2}} \qquad \text{Equação 2.2}$$

Este parâmetro apresenta-se actualmente como uma característica importante dos diagramas de fases uma vez que o seu valor é geralmente constante, quando está presente um SDFA de polímeros (Albertsson, 1971) e a sua avaliação, comparação com uma média para um dado sistema e nova medição para valores afastados dessa média é provavelmente o melhor método para obter diagramas de fases fiáveis (Zaslavsky, 1995).

Deve ser realçado que os polímeros sintéticos são geralmente polidispersos, podendo a distribuição das suas massas moleculares variar de lote para lote, mesmo quando obtidos do mesmo fabricante. Assim, a posição da binodal para um dado sistema não pode ser vista como uma constante físico-química do sistema.

Determinação experimental do diagrama de fases

Existem algumas técnicas experimentais que permitem obter os dados para a construção de um sistema de duas fases aquosas. De seguida, descrevem-se essas técnicas.

Binodal

A binodal de um SDFA pode ser determinada experimentalmente por uma de duas técnicas conhecidas.

Numa das técnicas adiciona-se, gota a gota, uma solução de um determinado polímero, de concentração conhecida, a uma solução de outro polímero, também de concentração conhecida, agitando-se bem entre cada adição. O aparecimento de uma solução turva, significa que se está a passar da região de miscibilidade total para a zona de duas fases, correspondendo essas concentrações a um ponto da binodal. Por adição de pequenas quantidades de água (obtenção de solução homogénea) e repetição do mesmo procedimento podem obter-se mais pontos da binodal. De referir que este método é pouco rigoroso devido ao carácter polidisperso dos polímeros, que origina que a mudança de solução límpida para turva seja gradual.

A outra técnica consiste em determinar experimentalmente as composições das fases em equilíbrio para várias composições iniciais. A binodal é obtida pela curva que une os pontos que representam as composições de equilíbrio. Para a determinação das composições das fases são necessários tantos métodos independentes quanto os componentes que se vão distribuir entre as fases. Em sistemas aquosos com dois polímeros, as técnicas mais usadas são a determinação do índice de refracção, da rotação óptica (polarimetria) e da massa seca.

Linha de ligação

As linhas de ligação são linhas que unem as composições de equilíbrio. De referir que, conhecida a composição inicial, a razão de massa entre as duas fases e a composição de uma das fases de equilíbrio, pode obter-se a composição da outra fase recorrendo a um balanço material:

$$\frac{m_s}{m_i} = \frac{(W_i - W_0)}{(W_0 - W_s)} \qquad \text{Equação 2.3}$$

em que m é a massa; W é a concentração; e os índices 's', 'i' e '0' designam, respectivamente, superior, inferior e inicial.

Ponto crítico

O ponto crítico é geralmente obtido através da extrapolação, até à binodal, da linha que passa pelos pontos médios das linhas de ligação. Convém que estas não sejam muito afastadas do ponto crítico.

Factores que afectam as composições de equilíbrio

O factor mais importante para a separação das fases é a natureza química dos polímeros. A seguir analisam-se alguns factores que afectam as composições de equilíbrio.

Efeito da massa molecular dos polímeros

De uma forma geral quanto maior for a massa molecular de um polímero, menor será a concentração necessária, desse mesmo polímero, para que ocorra separação de fases e quanto maior for a diferença entre as massas moleculares dos polímeros mais assimétrica será a binodal. (Albertsson, 1986; Diamond e Hsu, 1989; Abbott et al, 1993). Zaslavsky (1995) indica que outro factor que parece estar relacionado com a massa molecular dos polímeros é o declive da linha de ligação. No entanto, os dados até agora divulgados são inconclusivos. Por exemplo, no sistema PEG-dextrano o valor do STL diminui com o aumento da massa molecular do dextrano. Por outro lado, o seu valor aumenta com a massa molecular de PEG, em sistemas PEG-sal.

Efeito da temperatura

Nos SDFA compostos por dois polímeros, a concentração necessária dos mesmos para ocorrer a separação das fases é geralmente tanto maior quanto mais elevada for a temperatura (Albertsson, 1986).

Assim, um aumento da temperatura origina que a binodal se mova na direcção de concentrações mais elevadas, diminuindo o tamanho do comprimento da linha de ligação. Tal efeito é, no entanto, mais acentuado na zona próxima do ponto crítico, e esta deve ser a razão pela qual os sistemas parecem ter um declive diferente para composições próximas do ponto crítico, comparativamente a pontos afastados deste ponto.

No caso SDFA compostos por um polímero e um sal o efeito é contrário, isto é, o aumento da temperatura conduz a uma diminuição das concentrações de polímeros e sal necessárias ao aparecimento de duas fases.

Efeito da adição de sais

O efeito da adição de sais nos sistemas varia com o sal e com o próprio sistema. Albertsson (1985) constatou que os sistemas compostos por polímeros não iónicos são dificilmente afectados pela adição de, por exemplo, sacarose ou NaCl. Estes resultados foram confirmados por Zaslavsky e colaboradores (1986, 1987, 1988) que verificaram também que a adição de sais polivalentes (fosfatos, sulfatos e tartaratos) desloca a binodal para a zona de menores concentrações.

Quanto aos sistemas compostos por um polímero e um sal, a adição de sais resulta, como seria de esperar, no deslocamento da binodal no sentido das menores concentrações (Zaslavsky et al., 1988).

2.3.4 Partição em sistemas de duas fases aquosas

Existem muitas variáveis que afectam a partição de um soluto nos SDFA (numericamente quantificado pelo coeficiente de partição, K). Estas variáveis incluem o tipo, massa molecular e concentração dos polímeros que formam as fases, tipo e concentração de aditivos, pH, temperatura, entre outros (Zaslavsky, 1995).

Apesar destas variáveis serem todas mutuamente dependentes e ainda não completamente compreendidas, torna-se necessário fazer a análise dos efeitos de cada uma delas separadamente.

Efeito da composição do polímero

Num sistema polímero-polímero, o termo composição do polímero diz respeito a três variáveis diferentes (Zaslavsky, 1995). Assim, para cada um dos polímeros predominantes em cada uma das fases devem considerar-se:

- Tipo ou estrutura química do polímero;
- Massa molecular do polímero;
- Concentração do polímero.

Quando o SDFA é um sistema polímero-sal não é considerada variável a massa molecular.

Segundo Zaslavsky (1995) existem algumas regras que regem a influência do polímero em cada uma das fases:

- para composições de um determinado sistema, próximas do ponto crítico, o valor do coeficiente de partição é aproximadamente igual a 1. Tal deve-se ao facto de que o ponto crítico corresponde ao ponto em que, teoricamente, a composição das fases é semelhante, acontecendo o mesmo às suas propriedades. Este dado foi também verificado por Albertsson (1971) e Johansson (1985);
- aumentando a concentração total do polímero, o valor do coeficiente de partição afasta-se da unidade. Neste caso, as composições das fases em equilíbrio são substancialmente diferentes, aumentando a diferença entre as propriedades das fases, o que proporciona uma força motriz para o soluto migrar para uma fase em detrimento de outra.

- diminuindo a massa molecular de um dos polímeros aumenta a partição do soluto para a fase rica nesse polímero. Este efeito da massa molecular do polímero na partição do soluto não pode ser separado do efeito da concentração do polímero. Por outro lado, este efeito é tanto mais acentuado quanto maior for a massa molecular do soluto a separar.

Efeito de aditivos de baixa massa molecular

Segundo Zaslavsky (1995), a adição de solutos de baixa massa molecular quer iónicos (sais inorgânicos) quer não iónicos (ureia) afecta a partição de solutos nos SDFA. Existem dois mecanismos pelos quais a adição de compostos de baixa massa molecular afecta a partição de solutos.

O primeiro é baseado no efeito que o aditivo promoverá na composição e propriedades das fases, o segundo baseia-se nas alterações que o aditivo promoverá no soluto.

Relativamente ao primeiro tipo de mecanismo, os dados existentes até ao presente não permitem diferenciar os efeitos dos aditivos nas propriedades das fases, dos efeitos nas propriedades de um soluto, e seria necessária mais informação experimental (Zaslavsky, 1995), incluindo estudos dos efeitos de aditivos em diagramas de fases e de várias propriedades físico-químicas das fases, para compreender o efeito.

O segundo mecanismo pode acontecer quando, por exemplo, uma proteína, na presença de certos aditivos, poderá mudar de tamanho, sofrer alterações conformacionais ou ligar-se especificamente ao aditivo. Estas interacções são altamente específicas, podendo alterar drasticamente o valor do coeficiente de partição. Na Tabela 2.6 encontram-se alguns exemplos da influência de compostos de baixa massa molecular na partição da proteína e/ou enzima.

Tabela 2.6 Partição de proteína e/ou enzima em sistemas de duas fases aquosas com adição por compostos de baixo molecular

Proteína	Composto de baixa massa molecular	Referência
Albumina bovina sérica	Cl^-, CLO_4^-	Bergrren et al., 1995
Aminoácidos	SO_4^{2-}, Cl^-, CLO_4^-	Johansson et al., 1995
Albumina bovina sérica, Lisozima	CLO_4^-, I^-	Johansson et al., 1996
Cutinase	CLO_4^-	Cunha et al., 2000

A situação em que a proteína se liga especificamente ao aditivo é denominada por partição por afinidade. Utilizando esta técnica é possível particionar uma molécula biológica quase exclusivamente para uma das fases por integração de um ligando específico no SDFA. O ligando é covalentemente ligado a um dos polímeros utilizados na formação dos SDFA. Os ligantes aplicados à purificação de moléculas biológicas são, em grande maioria, corantes de triazina (por exemplo: Cibacron e Procion). Na Tabela 2.7 apresentam-se alguns exemplos onde a proteína se concentra preferencialmente numa das fases, devido à ligação específica a um ligante.

Tabela 2.7 Partição por afinidade de proteínas

Proteína	Ligante	Referência
Isoleucina-tRNA ligase	Isoleucina	Hustedt et al., 1977
Ribossomas	Antibióticos	Le Goffic et al., 1980
Albumina do soro bovina	l-triptofano	Backman, 1980
Albumina do soro humana	Cibacron Blue	Ling e Mattiasson, 1982
Glucose-6-fosfato desidrogenase	Cibacron Blue F3G-A Procion Yellow HE-3G	Cheng et al., 1990
Fosfatase	Procion Navy MX-RB	Kirchberger et al., 1992
Glucose-6-fosfato desidrogenase e hexoquinase	Cibacron Blue F3G Procion Red HE-3B	Xu et al., 2002

Efeito do pH

O efeito da variação do pH de um meio tamponado não pode ser facilmente diferenciado da adição de sais. Esta situação prende-se com o facto de ao variar o pH da solução variar a razão entre a concentração dos sais com poder tampão (Zaslavsky, 1995). Assim, podem ocorrer alterações nas propriedades do meio aquoso induzidas por uma dada variação de pH e/ou variação na composição do sal tampão correspondente.

Por outro lado, moléculas como proteínas, péptidos, entre outras, contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos dependendo do pH do meio. O pH do meio altera, não só a carga superficial do soluto, como também induz alterações conformacionais do soluto, podendo ocorrer assim a associação e a dissociação de subunidades.

Efeitos das características do soluto

Os efeitos do tamanho do soluto (massa molecular) e da sua estrutura química são bastante difíceis de distinguir (Zaslavsky, 1995).

Zaslavsky e colaboradores (1986, 1987) constataram que a partição do PEG e do PVA era independente da massa molecular do polímero para as gamas de massa molecular estudadas (de 1500 Da até 40000 Da para o PEG e de 20000 Da até 100000 Da para PVA); por outro lado, verificaram que, para as poliacrilamidas o coeficiente de partição aumentava com a massa molecular. Para as polivinilpirrolidina o efeito observado foi contrário, ou seja, o coeficiente de partição diminuía com o aumento da massa molecular. Deste modo concluíram que a característica que influencia a partição do soluto é a sua estrutura química e não o seu tamanho.

A influência da estrutura química da biomolécula parece ser explicada pela modificação (bio)química que a molécula pode sofrer (Zaslavsky, 1995), uma vez a partição é bastante específica, dependendo do tipo de biomolécula.

Determinação de parâmetros de extracção

Ao dissolver um soluto num SDFA, ele divide-se entre as fases. A sua distribuição é expressa em termos do coeficiente de partição (K), geralmente definido como a razão entre a concentração do soluto nas fases superior e inferior. Assim:

$$K = \frac{W_s}{W_i} \qquad \text{Equação 2.4}$$

Em que "W" representa a concentração do polímero ou sal, "s" fase superior e "i" fase inferior.

A razão do volume de fases (PR), que representa a razão entre os volumes encontrados na fase superior e inferior, após o SDFA, é calculada como:

$$PR = \frac{V_s}{V_i} \qquad \text{Equação 2.5}$$

Em que "V" é o volume.

A recuperação (Recup.) da enzima ou proteína após a etapa de extracção é calculada da seguinte forma:

$$\text{Recup.} = \frac{m_{recuperada}}{m_0} \times 100 \qquad \text{Equação 2.6}$$

Em que "m" é a massa e "0" designa inicial.

O factor de purificação é definido como equação 2.7

$$\text{Factor purificação} = \frac{\text{Recup.}_{enzima}}{\text{Recup.}_{Proteína}} \qquad \text{Equação 2.7}$$

Por último, o factor de concentração é definido:

$$\text{Factor concentração} = \frac{V_0}{V_f} \qquad \text{Equação 2.8}$$

2.3.5 Aplicações dos sistemas de duas fases aquosas

Nos últimos anos os SDFA têm sido desenvolvidos e aplicados em vários processos biotecnológicos (Kula et al., 1982; Albertsson, 1986). As áreas mais importantes de aplicação são a extracção e a purificação de proteínas, a recuperação de células e fracções subcelulares, o estudo das interacções entre biomoléculas e a bioconversão extractiva (Cabral e Aires-Barros, 1993).

As vantagens que têm contribuído para o sucesso da aplicação dos SDFA são:

- baixos tempos de processamento;
- elevadas capacidades volumétricas;
- facilidade no aumento de escala;
- recurso a equipamento utilizado na extracção líquido-líquido clássica;

- possibilidade de operação em contínuo;
- possibilidade de operação à temperatura ambiente

Por outro lado Kroner et al. (1984) e Harsa (1991) demonstraram que, economicamente, os SDFA apresentam vantagens quando comparados com outras técnicas de extracção. A principal aplicação dos sistemas de duas fases aquosas em biotecnologia reside na separação e purificação de proteínas (Tabela 2.8), em particular enzimas (Johansson, 1985).

Tabela 2.8 Proteínas/Enzimas purificadas utilizando SDFA

Fonte	Proteína/Enzima	Sistema	Referência
Kluyveromyces marxianus	Endo-PG	PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$	Presente trabalho
		PEG8000–PVA10000	
		Ucon–PVA10000	
Polyporus squamosu	Pectinase	PEG4000-Dex bruto	Antov, 2004
Soro queijo	α-lactalbumina β-lactoglobulina	PEG-$(NH_4)_2SO_4$	Rodrigues et al., 2001
Escherichia coli	Apolipoproteína	EOPO-água	Persson et al., 1998
Escherichia coli	Penicilina acilase	PEG-citrato sódio	Marcos et al., 1998
Fusarium solani pisi	Cutinase	PEG-fosfato	Sebastião et al., 1997
Aspergillus niger	α-galactosidase β-mananase	Ucon-Reppal PES100	Farkas et al., 1996
Escherichia coli	Aspartase	PEG1550–fosfato	Paulsen e Hustedt, 1994
Bacillus cereus	Leucina desidrogenase	PEG-fosfato	Schutte et al., 1994

As células e fracções celulares acumulam-se, geralmente, na fase inferior e a enzima ou proteína de interesse vai para a fase superior (Kula et al., 1982). Quando não é possível obter condições selectivas para a separação da enzima numa única etapa são usadas várias extracções sucessivas, dependendo do rendimento desejado e natureza dos contaminantes. As enzimas podem ser divididas em dois grupos: para uso industrial e para uso terapêutico. No primeiro caso, geralmente, é necessário uma preparação de pureza média/baixa, podendo conter outros contaminantes desde que não interfiram com a actuação da enzima pretendida. Assim, a extracção numa só etapa é suficiente. No segundo caso, em que se pretende um grau de pureza elevado, é necessário utilizar um processo de várias extracções sucessivas.

Os SDFA têm também sido usados em ensaios bioquímicos no fraccionamento e caracterização de células e fracções subcelulares. Os SDFA têm sido aplicados a vários tipos de células, organelos e vesículas membranares (Tabela 2.9)

Tabela 2.9 Aplicação do sistema de duas fases aquosas na partição de células (Albertsson, 1986)

Microrganismos	Células
B. thuringiensis	eritrócitos
S. cerevisiae	fibroblastos
Arthobacter simplex	hepatócitos
Staphlicoccus	monócitos

Os SFDA têm também sido aplicados em bioconversões extractivas (Cabral e Barros, 1993). O biocatalisador e substrato ficam retidos numa das fases enquanto o produto migra para a outra fase (Tabela 2.10).

Tabela 2.10 Exemplos de bioconversões extractivas efectuadas em SDFA

Conversão	Catalisador	Referência
celulose → açúcares redutores	endo-β-glucanase/β-glucosidase	Tjerneld et al., 1985 Tjerneld et al., 1991
amido → glucose	α-amilase	Larsson e Mattiasson, 1988 Li et al., 2002
lactose → glucose	β-galactosidase	Nguyen et al., 1988
monossacáridos→oligassacáridos	α-manosidade	Bartlett et al., 1992
Glucose → ácido acético	*E. coli*	Mattiasson e Hahn-Hägerdal, 1983
→ Glucose 6 fosfato desidrogenase	*Bacillus subtilis*	Tanaka et al., 1993

2.3.6 Sistemas de duas fases aquosas alternativos

Apesar das vantagens enumeradas na secção 2.3.5, existe uma limitação associada aos SDFA para separação de biomoléculas, usados à escala industrial, que é o elevado custo dos polímeros. O custo destes reagentes pode ascender a 74 % do custo total de produção (Datar, 1986). O dextrano, cadeia de monómeros de glucose, o polímero mais comummente usado juntamente com o PEG, é obtido por fermentação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides,* estirpe NRRL B512(f), em meios contendo sacarose como fonte de carbono (Albertsson, 1986; Coelho et al., 2000). Uma vez que a via de obtenção não é directa, o polímero torna-se caro.

Nos últimos anos, um elevado número de polímeros tem sido utilizado para substituir o Dextrano. Um dos polímeros mais utilizado como alternativa é o hidroxipropil amido, conhecido comercialmente como Reppal PES100 (Tjerneld

et al., 1986; Venâncio, 1996). A utilização deste polímero no sistema formado com o PEG permite baixar cerca de 7 vezes o custo da operação (Tjerneld et al, 1986).

Venâncio (1996) introduziu também os galactomananos (goma de guar, Solvitose Gum Ofa e farinha de alfarroba) como polímeros não purificados alternativos. Os sistemas resultantes apresentam elevada viscosidade, tornando mais difícil a sua operação.

Existem outros polímeros utilizados na obtenção de SDFA, conforme se pode constatar na Tabela 2.11.

Tabela 2.11 Sistemas de duas fases aquosas constituídos por dois polímeros, indicados na literatura, como alternativa ao sistema PEG-dextrano

Sistema	Referência bibliográfica
PEG-dextrano não purificado	Kroner et al., 1982
PEG – Reppal PES100	Tjerneld et al., 1986 Almeida et al., 1998
PEG - maltodextrina	Szlag e Giuliano, 1988 Silva e Meirelles, 2000
PEG - Pululano	Nguyen et al., 1988
Klucel L – Pluronic P105	Skuse et al., 1992
PEG – poli(etilenamida)	Dissing e Mattiasson, 1993
Poli(etilenamida)-hidroxi(etilcelulose)	Dissing e Mattiasson, 1993
PEG - agarose	Medin e Janson, 1993
PEG – goma de guar não purificada	Venâncio, 1996
PEG – farinha de alfarroba não purificada	Venâncio, 1996
PEG – Solvitose Gum Ofa	Venâncio, 1996
PEG - PVA	Presente trabalho

Ainda, como alternativa ao sistema PEG-dextrano, têm vindo a ser aplicados sistemas baseados em PEG e sais, nomeadamente PEG-fosfato e PEG-sulfato. Apesar de mais económicos, estes sistemas apresentam como desvantagem elevadas forças iónicas em ambas as fases, podendo conduzir à desnaturação das estruturas biológicas (Kula, 1989). Vários investigadores utilizaram estes sistemas conforme Tabela 2.12.

Tabela 2.12 Sistemas de duas fases aquosas constituídos por um polímero e um sal, referenciados na literatura

Sistema	Referência bibliográfica
PEG-fosfato ou PEG-sulfato	Kula et al.,1982 Veide et al., 1983 Veide et al.,1984 Boland et al., 1991 Papamichael et al., 1992 Sebastião et al., 1993 Sebastião et al., 1994 Cordes e Kula, 1994 Paulsen e Hustedt, 1994 Sebastião et al. ,1996 Presente trabalho

Uma outra possível alternativa ao sistema PEG–Dextrano é a utilização de sistemas onde os polímeros possam ser reciclados. Na secção seguinte serão abordados as características dos sistemas constituídos por polímeros termossensíveis.

2.3.7 Sistemas de duas fases aquosas com polímeros termossensíveis

A utilização de polímeros termossensíveis na extracção de biomoléculas por sistemas de duas fases aquosas permite, não só a reciclagem dos polímeros, como também uma separação fácil das biomoléculas presentes na fase rica em

polímero termossensível. Por outro lado, atendendo à significativa diferença de densidades entre as duas fases, a separação realiza-se mais rapidamente.

Os polímeros utilizados diferem em várias características físicas (ver Figura 2.5) como: estrutura da unidade do monómero, massa molecular, tipos de ramificações e hidrofobicidade.

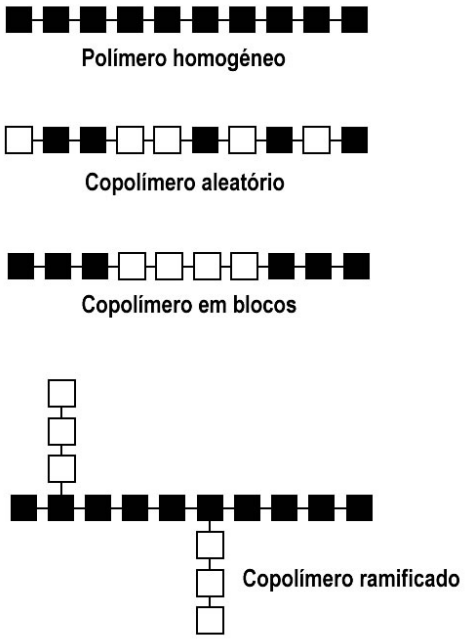


Figura 2.5 Representação esquemática de diferentes tipos de polímeros.

Uma solução aquosa contendo polímeros termossensíveis, fica turva à medida que se aumenta a temperatura. A temperatura mínima à qual se obtém uma solução turva é denominada por ponto de turvação ("cloud point temperature - CPT"). Neste ponto o copolímero forma gotículas macroscópicas que são insolúveis em água. Se a temperatura aumentar mais, as gotículas do copolímero vão agregar-se e formar uma fase rica em copolímero em equilíbrio com a fase rica em água.

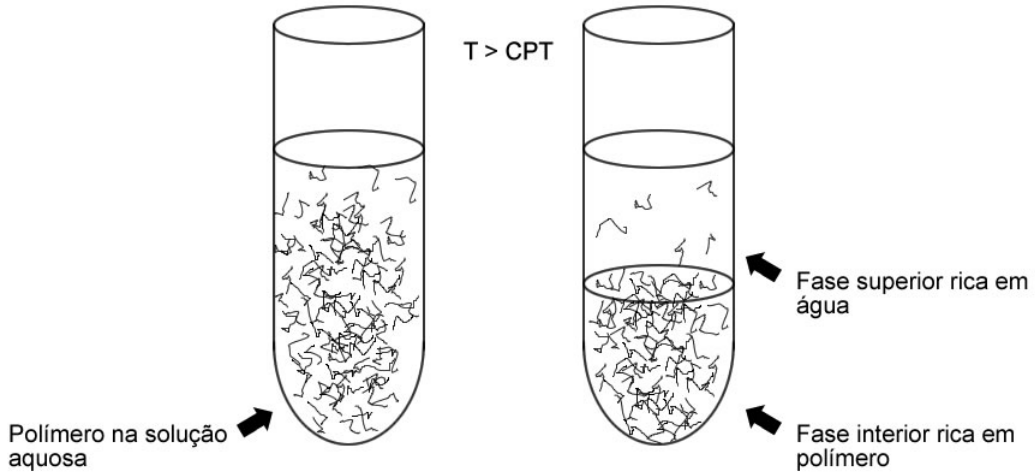


Figura 2.6 Representação esquemática da separação de um polímero termossensível em água, após o aquecimento (T>CPT) (adaptado de Persson, 1999).

Existem vários tipos de polímeros termossensíveis (Figura 2.7), dos quais se destacam: PEG (Saeki et al., 1976), copolímeros de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) – EOPO (Harris et al.,1991; Alred et al., 1992, 1994, Persson et al., 1998; Persson et al., 1999a, Zhu et al., 2002) e o EOPO modificado hidrofobicamente – HM – EOPO (Persson, 1999b).

No caso do EOPO, a percentagem, em peso, de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) pode variar. Harris et al. (1991) usaram um copolímero com igual percentagem de EO e PO (EO50PO50). Alred et al. (1994), Berggren et al. (1995, 1999), Persson et al. (1998) usaram um copolímero de composição EO30PO70 ou de composição EO20PO80. A proporção entre EO e PO afecta o ponto de turvação (Alred et al., 1994; Harris et al., 1991). Os copolímeros que contenham maior proporção da unidade hidrofóbica PO têm um ponto de turvação inferior.

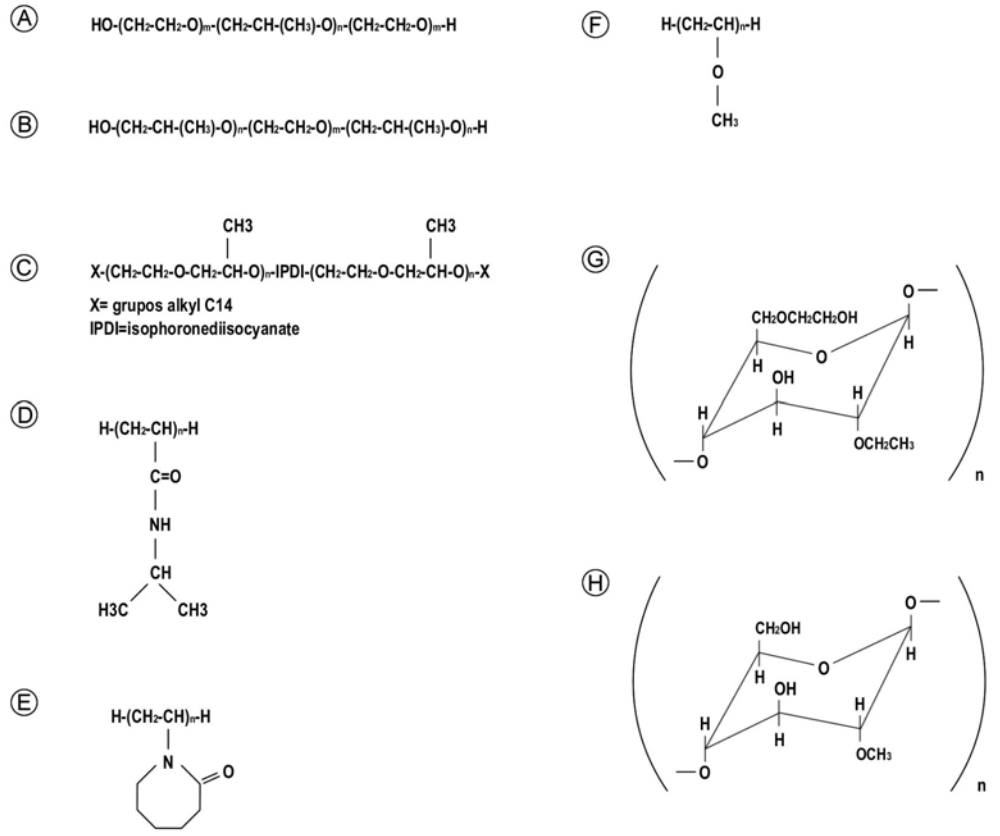


Figura 2.7 Exemplos de alguns polímeros termossensíveis usados nos SDFA. (A) polímeros aleatórios de óxido de etileno e óxido de propileno (EOPO), (B) polímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno (EOPOEO ou POEOPO), (C) copolímeros de EOPO modificados hidrofobicamente (HM-EOPO), (D) polímeros de poli(N-isopropilacrilamida) ou poli(NIPAM), (E) polivinilcaprolatano ou poli(VCL), (F) poli(vinilmetiléter) ou poli(VME), (G) etil(hidroxietilcelulose) ou EHEC, (H) metilcelulose (MC).

O PEG, também considerado polímero termossensível, não é tão comummente usado, uma vez que o ponto de turvação é de cerca 180 ºC para estruturas de baixa massa molecular e decresce com o aumento da massa molecular atingindo os 95 ºC para estruturas de massa molecular de 200 kDa ou mais (Bailey e Koleske, 1976).

Na Tabela 2.13 estão presentes alguns sistemas com polímeros termossensíveis encontrados na bibliografia e sua aplicação.

Tabela 2.13 Sistemas de duas fases aquosas utilizando polímeros termossensíveis e sua aplicação

Sistema	Aplicação	Referência
HM-EOPO	Apolipoproteina A-1	Johansson et al., 1999
Breox PAG 50A 1000–HM-EOPO	BSA, lisozima, Apolipoproteina A-1	Persson et al, 1999a
Breox PAG 50A 1000–Reppal PES 100	Apolipoproteina A-1	Persson et al., 1999b
EO30PO70-Dextrano	Péptidos, cutinase	Berggren et al., 2000

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, N.L., Blankschtein, D. e Hatton, T.A. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer system. 5. Decoupling of the effects of protein concentration, salt type, and polymer molecular weight. *Macromolecules*. 26, 825-828. 1993.

Albersheim, P., Neukom, H. e Deuel, H. Splitting of pectin chain molecules in neutral solution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 90, 46–51. 1960.

Albertsson, P. A. Chromatography and partition of cells and cells fragments. *Nature*. 177, 771-774. 1956.

Albertsson, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules. 3rd ed., John Wiley and Sons, New York. 1986.

Albertsson, P.A. Partition of cell particles and macromulecules. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York. 1971.

Albertsson, P.A. Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses, and applications to biotechnology. Em Walter, H., Brooks, D.E. e Fisher, D. (Eds.). Academic Press, London. 1985.

Almeida, C., Brányik, T., Moradas-Ferreira, P. e Teixeira, J. Continuous Production of Pectinase by Immobilized Yeast Cells on Spent Grains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96 (6), 513-518. 2003.

Almeida, C., Brányik, T., Moradas-Ferreira, P. e Teixeira, J. Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain. *Process Biochemistry*. 40 (5), 1937-1942. 2005.

Almeida, M. C., Venâncio, A., Teixeira, J. A. e Aires-Barros, M. R. Cutinase purification on poly(ethylene glycol) – hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*. 711, 151-159. 1998.

Alred, P. A., Tjerneld, F., Kozlawski, A. e Harris, M. J. Synthesis of dye conjugates of ethylene oxide-propylene oxide copolymers and application in temperature-induced phase partitioning. *Bioseparation*. 2, 363-373. 1992.

Alred, P. A., Kozlawski, A., Harris, M. J. e Tjerneld, F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. *Journal of Chromatography A*. 659, 289-298. 1994.

Antov, M. G. Partitioning of pectinase produced by Polyporus squamosus in aqueous two-phase system polyethylene glycol 4000/crude dextran at different initial pH values. *Carbohydrate Polymers*. 56 (3), 295-300. 2004.

Backman, L. Protein-protein interactions studied by counter-current distribution. II. Test of the theoretical model using bovine serum albumin and l-tryptophan. *Journal of Chromatography*. 196, 207-216. 1980.

Bai, Z. H., Zhang, H. X., Qi, H. Y., Peng, X. W. e Li, B. J. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Tecnhology*. 95 (1), 49-52. 2004.

Bailey, F.E. e Koleske, J.V. Poly(ethylene oxide). Academic Press, New York. 1976.

Baker, R. A. e Wicker, L. Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*. 7 (9), 279-284. 1996.

Barnby, F.M. An investigation of the pectinolytic system of *Kluyveromyces marxianus*. Universisty of Reading, United Kingdoom. PhD thesis. 1987.

Barnby, F. M., Morpeth, F. F. e Pyle, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus.* I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 12, 891-897. 1990.

Bartlett, T. J., Rastall, R. A., Rees, N. H., Adlard, M. W. e Bucke, C. The application of aqueous two-phase systems to oligosaccharide synthesis by α-mannosidase catalysed glycosyl transfer reactions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 55, 73-78. 1992.

Bateman, D. F. e Basham, H. G. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. Em Physiological Plant Pathology, Encyclopedia of Plant Physiology, News series vol.4 (Eds. R. Heitfuss and P. H. Williams) Springer-Verlag. Berlim. 1976.

Beijernick, M. W. Original mitteilung uber eine eigentumlichkeit der loslichen starke. *Centrabl Bakteriologie, Parasitenkunde Infektioskrankheiten. 22*, 699-701. 1896.

Berggren, K., Johansson, H.-O. e Tjerneld, F. Effects of salts and the surface hydrophobicity of proteins on partitioning in aqueous two-phase systems

containing thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. *Journal of Chromatography A*. 718, 67-79. 1995.

Berggren, K., Veide, A., Nygren, P.-A. e Tjerneld, F. Genetic engineering of protein-peptide fusions for control of protein partitioning in thermoseparating aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 62, 135-144. 1999.

Berggren, K., Nilsson, A., Johansson, G., Bandmann, N., Nygren P.-A. e Tjerneld, F. Partitioning of peptides and recombinant protein-peptide fusions in thermoseparating aqueous two-phase systems: effect of peptide primary structure. *Journal of Chromatography B*. 743, 295-306. 2000.

Blanco, P., Sieiro, C., Díaz, A., Reboredo, N. M. e Villa, T. G. Grape juice biodegradation by polygalacturonases from Saccharomyces cerevisiae. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 40 (2-4), 115-118, 1997.

Blanco, P., Sieiro, C. e Villa, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*.175, 1-9. 1999.

Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S. S. e Webb, C. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*. 37 (5), 497-503. 2001.

Boland, M. J., Hesselink, P. G. M., Papamichael, N. e Hustedt, H. Extractive purification of enzymes from animal using aueous two-phse systems: pilot scale studies. *Journal of Biotechnology*. 19, 19-34. 1991.

Botella, C., Ory, I. de, Webb, C., Cantero, D. e Blandino, A. Hydrolytic enzyme production by Aspergillus awamori on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*. 26 (2-3), 100-106. 2005.

Busto, M. D., García-Tramontín, K. E., Ortega, N. e Perez-Mateos, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresource Technology*. In press.

Byrde, R. J. W. Fungal pectinases from ribosomes to plant cell wall. *Transactions of the British Mycological Society*. 79, 1-14. 1982.

Cabral, J.M.S. e Aires-Barros, M.R. Recovery processes for biological materials. Em Kennedy, J.F. e Cabral, J.M.S. (Eds). John Wiley and Sons, pág. 290-302. 1993.

Cheng, L., Joelsson, M. e Johansson, G., Combination of polymer-bound charged groups and affinity ligands for extraction of enzymes by partitioning in aqueous two-phase systems. *Jounal of Chromatography A*. 523, 119-130. 1990.

Codner, R. C. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. Journal of Applied Bacteriology. 84, 147–60. 2001.

Coelho, M., Teixeira, J. A. e Rodrigues, A. E. Production of dextransucrase, dextran and frutose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB512(f). *Biochemical Engineering Journal*. 4, 177-188. 2000.

Cooke, R. D., Ferber, C. E. M. e Kanagasabapathy, L. Purification and characterisation of polygalacturonases from a commercial *Aspergillus niger* preparation. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 452, 440-451. 1976.

Cordes, A. e Kula, M.-R. Large-scale purificationof formate dehydrogenase. Em : Walter H. e Johansson G. (Eds.) Aqueous two-phase systems. Academic Press. Nova Iorque. Pág 600-608. 1994.

Corredig, M., Kerr, W. e Wicker, L. Separation of thermostable pectinmethylesterase from marsh grapefruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 4918–4923. 2000.

Cunha, M. T., Cabral, J. M. S., Tjerneld, F. e Aires-Barros, M. R. Effect of salts and surfactants on the partitioning of Fusarium solani pisi cutinase in aqueous two-phase systems of thermoseparating ethylene oxide/propylene oxide random copolymer and hydroxypropyl starch. *Bioseparation*. 9, 203-209. 2000.

Datar, R. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochemistry*. 21, 19-26. 1986.

De Vries, J. A., Uijl, C. H. den, Voragen, A. G. J., Rombouts, F. M. e Pilnik, W. Strutural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymer*. 3, 193-205. 1983.

Diamond, A. D., Hsu, J. T. Protein partitioning in PEG/Dextran aqueous two-phase systems. *AIChE Journal*. 36, 1017-1024. 1990.

Diamond, A. D. e Hsu, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 34, 1000-1014. 1989.

Dissing, U. e Mattiasson, B. Poly(ethyleneimine) as a phase forming polymer in aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 17, 15-21. 1993.

Farkas, T., Stalbrand, H. e Tjerneld, F. Partitioning of β-mannanase and α-galactosidase from *Aspergillus niger* in Ucon-Reppal aqueous two-phase systems and using temperature-induced phase separation. Bioseparation. 6, 147-157. 1996.

Fernández-González, M., Úbeda, J. F., Vasudevan, T.G., Cordero Otero, R.R. e Briones, A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology Letters*. 237(2), 261-266. 2004.

Gainvors, A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nedjma, M. e Belarbin, A. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 183, 131-135. 2000.

Garcia-Garibay, M., Gomez-Ruiz, L. e Barzana, E. Studies on the simultaneous production of single cell protein and poligalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*. 9 (6), 411-470. 1987.

Gomez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M. e Barzana, E. Utilization of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. *Journal of Food Science*. 53 (4), 1236-1240. 1988.

Goodwin, T. W. e Mercer, E. I. Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press, Oxford. 1980.

Harris, P., Karlström, G. e Tjerneld, F. Enzyme purification using temperature-induced phase formation. *Bioseparation*. 2, 237-246. 1991.

Harsa, S. Studies on the ion-exchange of pectinase. Universisty of Reading, United Kingdom. PhD thesis. 1991.

Hasunuma, T., Fukusaki, E. I. e Kobayashi, A. Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. *Journal of Biotechnology*. 106, 45-52. 2003.

Huddleston, J., Veide, A., Köhler, K., Flanagan, J., Enfors, S.-O. e Lyddiatt, A. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *Tibtech*. 9, 381-388. 1991.

Hustedt, H., Kroner, K.H. e Kula, M.-R. *Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses, and applications to biotechnology*. Em Walter, H., Brooks, D.E. e Fisher, D. (Eds.) Academic Press, Londres. 1985.

Hustedt, H., Flossdorf, J. e Kula, M.-R. Interacting binding sites of isoleucyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* studied by equilibrium partition. *European Journal of Biochemistry*. 74, 199-202. 1977.

Jayani, R. S., Saxena, S. e Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 40, 2931–2944. 2005.

Johansson, G. Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses, and applications to biotechnology. Em Walter, H., Brooks, D.E. e Fisher, D. (Eds.) Academic Press, Londres. 1985.

Johansson, H.-O., Karlström, G., Mattiasson, B. e Tjerneld, F. Effects of hydrophobicity and counter ions on the partitioning of aminoacids in thermoseparating Ucon-water two-phase systems. *Bioseparation*. 5, 269-279. 1995.

Johansson, H.-O., Lundh, G., Karlström, G. e Tjerneld, F. Effects of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide co-polymers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1290, 289-298. 1996.

Johansson, H.-O., Persson, J. e Tjerneld, F. Thermoseparating water/polymer systEm a novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. *Biotechnology and Bioengineering*. 66(4), 247-257. 1999.

Johansson, H.-O., Karlström, G., Tjerneld, F. e Haynes, C.A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 711, 3-17. 1998.

Kashyap, D. R., Soni, S. K. e Tewari, R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 88 (3), 251-254. 2003.

Kaur, G., Kumar, S. e Satyanarayana, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis**.** *Bioresource Technology*. 94 (3), 239-243. 2004.

Keenan, M. H. J., Belton, P. S., Matthew, J. A. e Howson, S. J., A study of sugar-beet pectin. *Carbohydrate Research*. 138, 168-171. 1985.

Kertesz, Z. I. The pectic substances. Interscience publishers Inc, Nova Iorque. 1951.

Kester, C. M. e Visser, J. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 12, 150-160. 1990.

Kirchberger, J., Domar, U., Kopperschläger, G. e Stigbrand, T., Interactions of human alkaline phosphatase isoenzymes with triazine dyes using affinity partitioning, affinity chromatography and difference spectroscopy. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 574 (2), 237-245. 1992.

Kroner, K.H., Hustedt, H. e Kula, M.-R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. *Process Biochemistry*. 19, 170-179. 1984.

Kroner, K.H., Hustedt, H. e Kula, M.-R. Evaluation of crude dextran as a phase forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. *Biotechnology and Bioengineering.* 24, 1015-1045. 1982.

Kula, M.-R., Kroner, K. H. e Hustedt, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering. 24*, 73-118. 1982.

Kula, M.-R. Large scale protein recovery using aqueous phase systems. Em Fisher D. e Sutherland I. A. (Eds.) Separations using aqueous phse systems. Plenum Press, Londres. Pág. 295-298. 1989.

Larsson, M. e Mattiasson, B. Characterization of aqueous two-phase systems based on polydisperse phase forming polymers: enzymatic hydrolysis of starch in PEG-starch aqueous two-phase system. *Biotechnology and Bioengineering*. 31, 979-983. 1988.

Lee, W. C., Yusof, S., Hamid, N. S. A. e Baharin, B.S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*. 73 (1), 55-63. 2006.

Le Goffic, F., Moreau, N., Langrené, S. e Pasquier, A. Binding of antibiotics to the bacterial ribosome studied by aqueous two-phase partitioning. *Analytical Biochemistry*. 107, 417-423. 1980.

Li, M., Kim, J-W., Peeples e T. L. Amylase partitioning and extractive bioconversion of starch using thermoseparating aqueous two-phase systems, *Journal of Biotechnology*. 93, 15-26. 2002.

Ling, T.G.I. e Mattiasson, B. Comparison between binding analysis performed by equilibrium dialysis and partitioning in aqueous two-phase systems exemplified by the binding of Cibacron Blue to serum albumine. *Journal of Chromatography*. 252, 159-166. 1982.

Luh, B. S. e Phaff, H. J. Studies on poligalacturonase of certain yeasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 33, 212-227. 1951.

Luh, B. S. e Phaff, H. J. Properties of yeast polygalacturonase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 48, 23-37, 1954a.

Marcos, J. C., Fonseca, L. P., Ramalho, M. T. e Cabral, J. M. S. Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*. 711, 295-299. 1998.

Mattiasson, B. e Hanh-Härgerdal, B. Utilisation of aqueous two-phase systems for generating soluble immobilized preparations of biocatalysts. Em Mattiasson B. (Ed.) Immobilized cells and organelles, Vol I CRC Press, Inc., pág 121-134. 1983.

Medin, A. S. e Janson, J.-C. Studies on aqueous two-phase systems containing agarose. *Carbohydrate Polymers*. 22, 127-136. 1993.

Moyo, S., Gashe, B. A., Collison, E. K. e Mpuchane, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*. 85(1-2), 87-100. 2003.

Nagai, M., Katsuragi, T., Terashita, T., Yoshikawa, K. e Sakai, T. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 64,1729–1732. 2000.

Nguyen, A.-L., Grothe, S. e Luong, H. T. Applications of pullulan in aqueous two-phase systems for enzyme production, purification and utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 27, 341-346. 1988.

Palomäki, T. e Saarilahti H. T. Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonases in *Erwinia carotovora ssp. carotovora. FEBS Letters*. 400, 122-126. 1997.

Papamichael, N., Börner, B. e Hustedt, H. Continuous aqueous-phase extraction of proteins automated processing and recycling of process chemicals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 54, 47-55. 1992.

Paulsen, J. e Hustedt, H. *Extractive purification of aspartase from Escherichia coli K12*. EmWalter H. e Johansson, G. (Eds.). *Aqueous two-phase systems*. Academic Press, Nova Iorque, pág. 590-599. 1994.

Persson, J., Nyström, L., Ageland, H. e Tjerneld, F. Purification of recombinant apolipoprotein A-1_{Milano} expressed in *Escherichia coli* using aqueous two-phase extraction followed by temperature induced phase separation. *Journal of Chromatography B. 711*, 97-109. 1998.

Persson, J. Recombinant Protein Purification using thermoseparating aqueous two-phase systems. Lund University, Suécia. PhD thesis. 1999

Persson, J., Johansson, H.O. e Tjerneld, F. *Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers*. *Journal of Chromatography A*. 864, 31-48. 1999a.

Persson, J., Nyström, L., Ageland, H. e Tjerneld, F. Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and

surfactant with temperature-induced phase separation. *Biotechnology and Bioengineering*. 65, 371-381. 1999b.

Phaff, H. J. e Demain, A. L. The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. J*ournal of Biological Chemistry.* 218, 875-884. 1956.

Rexovä-Benkovä, L. e Markovic, O. Pectic enzymes. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 33. (Eds R.S. Tipson e D. Horton). Academic Press. Nova Iorque. 1976.

Rodrigues, L.R., Venâncio, A. e Teixeira, J. A. Partitioning and separation of α-lactalbumin and β-lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. *Biotechnology Letters*. 23, 1893-1897. 2001.

Rose, A. H. e Harrison, J. S., The yeasts. Volume 1. Academic Press. London e Nova Iorque. 1969.

Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M. e Kaneko, M. Upper and lower critical solution temperatures in poly(ethylene glycol) solution. *Polymer*. 17, 685-689. 1976.

Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J. e Vandamme E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology.* 39, 231–94. 1993.

Sakai T. Degradation of pectins. Winkelmann G, editor. Microbial degradation of natural products. Weinheim: VCH. 1992.

Sanchez, J., Guirand, J. P. e Galzy, P. A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 20, 262-267. 1984.

Schütte, H., Schustolla, D. e Hustedt, H. Extraction of leucine dehydrogenase from Bacillus cereus. Em Walter H. e Johansson G. (Eds). Aqueous two-phase systems. Academic Press, Nova Iorque. Pág 608-617. 1994.

Schwan, R. F., Cooper, R. M. e Wheals, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. 21, 234-244. 1997.

Schwan, R. e Rose, A. H., Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. J*ournal of Applied Bacteriology*. 76, 62-67. 1994.

Skuse, D. R., Norris-Jones, R., Yalpani, M. e Brooks, D. E. Hydroxypropyl cellulose/poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: system characterization and partition of cells and proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 14, 785-790. 1992.

Sebastião, M. J., Martel, P. Baptista, A., Petersen, S. B., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R. Predicting the partition coefficients of a recombinant cutinase in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 56 (3), 248-257. 1997.

Sebastião, M. J., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R. *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase patitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Biotechnology Techniques*. 7, 631-634. 1993.

Sebastião, M. J., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R. Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase system. *Journal of Chromatography A*. 668, 139-144. 1994.

Sebastião, M. J., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R. Improved purification protocol of a *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase by phase patitioning in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and phosphate. *Enzyme and Microbial Technology*. 18, 251-260. 1996.

Shanley, N. A., van den Broek, L. A. M., Voragen, A. G. J. e Coughlan, M. P. Isolation and characterization of an endopolygalacturonase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*. 28 (2-3), 179-197. 1993.

Sharma, D. C. e Satyanarayana, T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by Bacillus pumilus dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology*. In press.

Silva, D., Tokuioshi, K., Martins, E. S., Silva, R. e Gomes, E., Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. Process Biochemistry. 40(8) 2885-2889. 2005a.

Silva, E. G., Borges, M. F., Medina, C., Piccoli, R. H. e Schwan, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. F*EMS Yeast Research*. 5 (9), 859-865. 2005b.

Silva, L.H.M. e Meirelles, A.J.A. Bovine serum albumin, α-lactoalbumin and β-lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymer*. 42, 279-282. 2000.

Singh, S. A. e Rao, A. G. A. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35, 115–23. 2002.

Souza, J. V. B., Silva, E. S., Maia, M. L. S. e Teixeira, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus 2A.UM*IDA.1. *Process Biochemistry.* 39 (4), 455-458, 2003.

Szlag, D. C. e Giuliano, K. A. A low cost aqueous two-phase system for enzyme extraction. *Biotechnology Techniques*. 2, 277-282. 1988.

Tanaka H., Kuboi, R., Komasawa, I. e Tsuchido, T. Control autolysis of Bacillus subtilis for selective production of the intracellular enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase in aqueous two-hase systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75, 424-429. 1993.

Tjerneld, F., Berner, S., Cajarville, A. e Johansson, G. New aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. *Enzyme Microbiology Technology*. 8, 417-423. 1986.

Tjerneld, F., Persson, I., Albertsson, P. Å. e Hahn-Hägerdal, B. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. II-Semicontinuous conversion of a model substrate, Solka Floc BW 2000. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 1044-1050. 1985.

Tjerneld, F., Persson, I. e Lee, J. M. Enzymatic cellulose hydrolysis in an attrition bioreactor combined with an aqueous two-phase system. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 1044-1050. 1991.

Vaillant, F., Millan, P., O'Brien, G., Dornier, M., Decloux, M. e Reynes, M. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. Journal of Food Engineering. 42 (4), 215-224. 1999.

Veide, A. Smeds, A. L. e Enfors, S.-O. A process for large scale isolation of β-galactosidase from E. coli in an aqueous two-phase system. *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 1789-1800. 1983.

Veide, A., Leindbäck, T. e Enfors, S.-O. Continuous extraction of β-D-galactosidase from *Escherichia coli* in an aqueous two-phase systEm effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer. *Enzyme Microbiology Technology. 6,* 325-330. 1984.

Venâncio, A. Caracterização de novos sistemas para partição bifásica aquosa de biomoléculas. Dissertação de Doutoramento. Universidade do Minho, Portugal. 1996.

Vermeulen, T., Klein, G. e Hiester, N. K. Adsorption and ion-exchange. Em Chemical Engineer´s Handbook. (Eds Perry, R. H. and Chilton, C. H.) McGraw-Hill, New York. 1973.

Whitaker, JR. Microbial pectinolytic enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. *Microbial enzymes and biotechnology*. 2nd ed. London: Elsevier Science Ltd.; 1990.

Wimborne, M. P. e Rickard, A. D. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* in controlled environments. *Biotechnology and Bioengineering*. 20, 231-242. 1978.

Xu, Y., Vitolo, M., Albuquerque, C. N. e Pessoa Jr., A. Affinity partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase systems with free triazine dye ligands, *Journal of Chromatography B*. 780 (1), 53-60. 2002.

Yu, J. e Lencki, R. W. Effect of enzyme treatments on the fouling behavior of apple juice during microfiltration. *Journal of Food Engineering*. 63 (4), 413-423. 2004.

Zaslavsky, B.Y., Bagirov, T.O., Borovskaya, A.A., Gasanova, G.Z., Gulaeva, N.D., Levin, V.Y., Masimov, E.A., Mahmudov, A.U., Mestechkina, N.M., Miheeva, L.M. Osipov, N.N. e Rogozhin, S.V. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers II: concentration effects of inorganic salts on phase separation. *Colloid Polymer Science*. 264, 1066. 1986.

Zaslavsky, B.Y., Mahmudov, A.U., Bagirov, T.O., Borovskaya, A.A., Gasanova, G.Z., Gulaeva, N.D., Levin, V.Y., Mestechkina, N.M., Miheeva, L.M. e Rodnikova, M.N. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers I: effects of inorganic salts on phase separation. *Colloid Polymer Science*. 265, 548. 1987.

Zaslavsky, B. Y., Miheeva, L. M., Aleschko-Ozhevshii, Mahmudov, A. U., Bagirov, T. O. e Garaev, E. S. Distribution of inorganic salts between the coexisting phases of aqueous polymer two-phase systems. *Journal of Chromatography*. 439, 267-281. 1988.

Zaslavsky, B.Y. Aqueous two-phase partitioning. Marcel Dekker Inc., Nova Iorque. 1995.

Zhu, J. H., Wei, D. Z. e Cao, X. J. Effects of hydrophobicity of ethylene oxide-propylene oxide copolymers on phase diagrams of aqueous two-phase systems and partition behaviors of cephalexin and 7-aminodeacetoxicephalos-poranic acid. Chinese Journal of Chemical Engineering. 10, 240-243. 2002.



Capítulo 3

Materiais e Métodos

69	3	Materiais e Métodos
71	3.1	Fermentações das Estirpes de levedura
71	3.1.1	Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura
71	3.1.2	Armazenamento das leveduras *Kluyveromyces marxianus*
72	3.1.3	Fermentações descontínuas em balões Erlenmeyer ou frascos rolhados ou reactor de 2 L
74	3.1.4	Preparação das amostras para determinação da actividade enzimática
74	3.2	Métodos Analíticos
79	3.2.1	Actividade de endo-poligalacturonase
79	3.2.2	Biomassa
79	3.2.3	Proteína
80	3.2.4	Açúcares Redutores
80	3.2.5	Sacarose, glucose e frutose
81	3.3	Sistemas de duas fases aquosas
81	3.3.1	Reagentes utilizados nos SDFA
82	3.3.2	Ligandos
83	3.3.3	Equipamento utilizado nos SDFA
83	3.4	Referências Bibliográficas

Neste capítulo são abordados os vários materiais e metodologias comuns usados durante a execução deste trabalho. Começa-se por fazer uma abordagem à parte respeitante à tecnologia da fermentação, quer em termos de realização das fermentações, quer em termos de métodos analíticos usados para quantificação dos vários parâmetros.

De seguida, avança-se com materiais e métodos usados no processo de purificação.

Ao longo dos capítulos respeitantes aos resultados (capítulos 4, 5, 6 e 7) existe também uma secção relativa aos materiais e métodos usados especificamente para os resultados obtidos em cada um dos capítulos.

3.1 FERMENTAÇÕES DAS ESTIRPES DE LEVEDURA

3.1.1 Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura

Todo o material de vidro, meios de cultura e soluções para as diferentes estirpes foram esterilizados em autoclave a 121 ºC, durante 20 minutos.

3.1.2 Armazenamento das leveduras *Kluyveromyces marxianus*

As estirpes da levedura *Kluyveromyces marxianus* usadas no decorrer deste trabalho foram fornecidas pela Universidade Federal de Lavras, onde foram isoladas da fermentação de cacau. As estirpes encontravam-se em tubos inclinados mantidos a 4 ºC, contendo o seguinte meio: extracto de levedura 3,0 $g.L^{-1}$, peptona 5,0 $g.L^{-1}$, glucose 10,0 $g.L^{-1}$, extracto de malte 3,0 $g.L^{-1}$ e agar 15,0 $g.L^{-1}$.

As estirpes de *Klyveromyces marxianus* utilizadas foram as seguintes: CH4-1, CH5-1, CH5-3, CH5-4, CH9-1, CH1-1, CH0-1, CH8-1, CH2-2, CH8-9 e CCT 3172.

Após a recepção, as leveduras foram mantidas em cultura permanente durante a execução do trabalho. A cultura permanente foi preparada do seguinte modo: adicionou-se 1 mL de cultura em meio líquido crescido durante a noite, a 0,3 mL de glicerol esterilizado, agitou-se no vortex e incubou-se 10 minutos em gelo. De seguida, os tubos foram armazenados numa arca congeladora a -80 ºC.

Sempre que necessário procedia-se à recuperação das células, raspando a cultura congelada e riscando numa placa de agar com meio de cultura adequado. Nestas condições, o tubo de cultura permanente podia voltar a ser armazenado e utilizado novamente.

3.1.3 Fermentações descontínuas em balões Erlenmeyer ou frascos rolhados ou reactor de 2 L

Previamente ao estudo da separação da enzima utilizando SDFA, foi realizada uma breve caracterização das estirpes acima mencionadas em termos de produção de enzima (resultados apresentados no capítulo 4).

Após esta caracterização, a enzima para utilizar nos SDFA foi obtida por fermentação das estirpes que apresentam melhor desempenho na produção de enzima.

Para efectuar as fermentações utilizaram-se balões Erlenmeyer (produção da enzima para utilizar nos SDFA) ou frascos rolhados (caracterização das estirpes) de 250 mL com 100 mL de cultura, que foram colocados num agitador orbital, dentro de uma câmara termostatizada a 30 ºC, sem controlo de pH e sem arejamento. A composição do meio de fermentação, adaptado de Patching e Rose (1969) foi a seguinte: 1,0 $g.L^{-1}$ extracto de levedura, 3,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 4,5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0,25 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$ e 0,25 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$ e também fonte de carbono (ver Tabela 3.1)

Tabela 3.1 Estirpes de leveduras *K. marxianus* utilizadas na execução deste trabalho, e composição inicial da fonte de carbono no meio de cultura

Estirpes	Fonte de carbono	Capítulo
CH4-1, CH5-1, CH5-3, CH5-4, CH9-1, CH1-1, CH0-1, CH8-1, CH2-2, CH8-9 e CCT 3172	10 $g.L^{-1}$ glucose	4 (Selecção das estirpes)
CCT 3172	10 $g.L^{-1}$ glucose	6 (Separação da enzima)
CCT 3172	10 $g.L^{-1}$ glucose	7
CH0-1	10 $g.L^{-1}$ sacarose ou 10 $g.L^{-1}$ melaço	
CH4-1	30 $g.L^{-1}$ glucose	

Uma das fontes de carbono utilizada foi o melaço de cana-de-açúcar. Este substrato é uma matriz complexa, de alta viscosidade, o que torna difícil a sua completa homogeneização. Assim, verificou-se, por HPLC (ver 3.3.5), que a composição média de cada um dos açúcares principais é a seguinte: sacarose 30-35 %, glucose 15-20 %, frutose 20-25 %.

As fermentações descontínuas para avaliar efeito do oxigénio na produção da enzima (secção 4.3.2) foram realizadas numa unidade BIOSTAT B – B. Braun Biotec international GmbH – utilizando uma configuração de tanque agitado, com veio de dupla hélice e vaso de capacidade de 2 L. Durante as experiências foram controlados: a temperatura (30 ºC) utilizando uma sonda térmica PT 1000 e um banho termostático, o pH (5,0) recorrendo a um eléctrodo de pH Ingold e à adição através de uma bomba de uma solução 1:3 (V/V) de amónia comercial e a velocidade de agitação utilizada (150 rpm). O arejamento foi feito com ar comprimido, e as condições de anaerobiose eram asseguradas por injecção de azoto. Em ambos os casos a injecção era regulada por rotâmetro e, antes de passar pelo injector de 6 orifícios, o ar ou o azoto era esterilizado por filtração. A unidade possuía um condensador localizado na saída dos gases de exaustão para minimizar a perda em voláteis.

A calibração do eléctrodo de pH foi feita *a priori* recorrendo a duas soluções tampão pH=7,0 e pH=4,0 (Ingold, Suiça). O eléctrodo de oxigénio foi calibrado no próprio meio de fermentação, ajustando o zero quando o meio se encontrava saturado com azoto e o 100 % foi ajustado quando o meio se encontrava saturado com oxigénio à temperatura de operação.

O inóculo para o reactor foi preparado em balão Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de cultura e incubado, numa incubadora de agitação orbital a 150 rpm, a 30 ºC, durante 12 a 16 horas. Posteriormente, era transferido assepticamente para o vaso de fermentação.

3.1.4 Preparação das amostras para determinação da actividade enzimática

Para se proceder à determinação da actividade enzimática nas amostras, estas sofreram um tratamento prévio. Assim, após recolher a amostra da fermentação, centrifugou-se e filtrou-se por filtro de 0,45 μm. De seguida, colocou-se a amostra em diálise contra água destilada e com agitação, a 4 ºC, durante 18 horas. A membrana usada tinha uma porosidade de 14000 Da.

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos usados no capítulo 4, 5, 6 e 7 encontram-se a seguir descritos.

Um exemplo das curvas de calibração obtidas para cada parâmetro encontra-se no Anexo.

3.2.1 Actividade de endo-poligalacturonase

A determinação da actividade enzimática da endo-poligalacturonase foi efectuada utilizando dois métodos distintos. Ambos os métodos baseiam-se na quantificação de açúcares redutores libertados, pelo ácido poligalacturónico, para o meio. Contudo, a determinação dos açúcares redutores foi feita usando o ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Schwan and Rose, 1994) adaptado para microplaca (resultados obtidos no capítulo 6) ou usando cianoacetamida (Honda et al., 1982) (resultados obtidos nos capítulos 4, 6 e 7).

Assim, na determinação da actividade enzimática usando o DNS, é necessário preparar o reagente (Miller, 1959), de acordo com o procedimento descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Reagentes utilizados e preparação do reagente de DNS segundo Miller (1959)

Solução	Composição	Preparação
NaOH 2 N	20 g NaOH	Dissolver 20 g de NaOH em 100 mL de água e perfazer até 250 mL.
DNS	10 g ácido 3,5 dinitrosalicílico 200 mL NaOH 2 N 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio	Dissolver 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico em 500 mL de água destilada a 85ºC, num balão volumétrico de 1 L; aguardar até a solução atingir a temperatura ambiente; adicionar 200 mL de solução NaOH 2 N; adicionar 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio; perfazer o balão até 1L e guardar à temperatura ambiente num frasco escuro

Para dosear a actividade em cada amostra de sobrenadante da fermentação, preparou-se 8 tubos de digestão por adição de 350 μL de amostra a 250 μL de ácido poligalacturónico 1 % (p/V). Todos os tubos foram colocados em banho-maria a 40 ºC, e iniciou-se a contagem dos tempos. A cada 2,5 minutos retirou-se um tubo ao qual se adicionou 600 μL de DNS. Esta mistura foi fervida, a 100 ºC, em banho-maria durante 5 minutos. Parou-se a reacção mergulhando os tubos em água fria e, após o arrefecimento, usou-se 300 μL da solução obtida para ler a densidade óptica, em microplaca, a 540 nm (Tecan Spectra Rainbow). Na calibração usou-se padrões de ácido galacturónico na gama 0,025-2 $g.L^{-1}$.

Uma unidade (U) de actividade enzimática por unidade de volume (mL) é expressa em micromoles de ácido galacturónico libertado por minuto por mililitro de solução de enzima ($U.mL^{-1}$).

No sentido de optimizar o método para determinação da actividade enzimática baseado no método da cianoacetamida foram realizados ensaios em que se fez variar o pH (3, 4, 4,5, 5, 5,5 e 6) da solução contendo o substrato (ácido poligalacturónico) e também a temperatura (22, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 ºC) a que eram incubados os tubos para determinação da actividade enzimática.

Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 3.1.

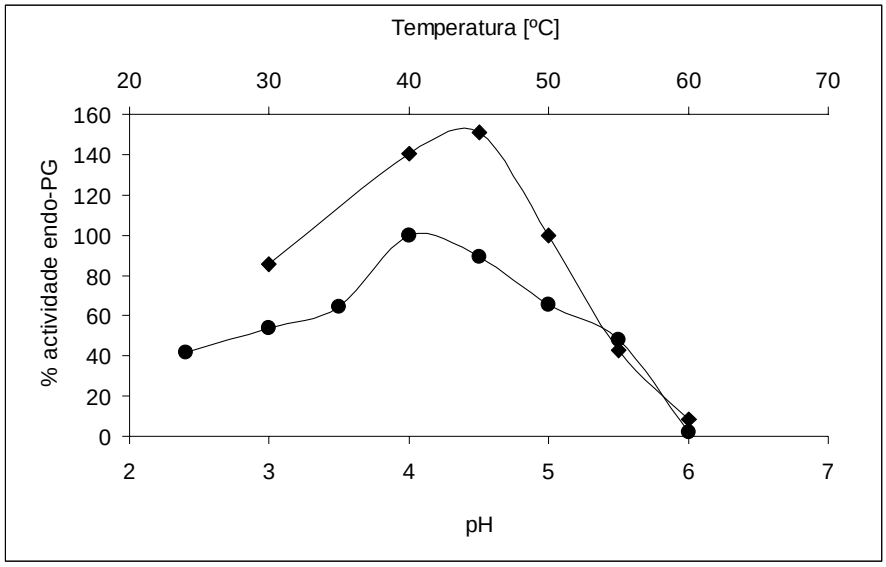


Figura 3.1 Percentagem dos valores de actividade enzimática encontrados em função da temperatura e pH (em relação a 40 ºC e pH=5, (Honda et al., 1982)). Temperatura (●), pH (◆).

Dos resultados acima seleccionou-se a temperatura de 40 ºC e o pH da solução de ácido poligalacturónico de 4,5.

Foram realizados estudos para verificar se a incubação dos tubos a uma temperatura controlada seria mais eficiente em banho-maria termostatizado ou

em estufa. Por outro lado, testou-se também o modo como são feitas as diluições da solução de enzima. Fez-se dois tipos de diluições: uma utilizando água destilada e outra utilizando solução tampão citrato 0,1 M, pH=4,5. Os resultados encontrados (em percentagem em relação às condições: diluição feita com água destilada, banho-maria termostatizado) estão presentes na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Percentagem dos valores encontrados em relação às condições: diluição feita com água destilada, banho-maria termostatizado, na determinação da actividade enzimática (método baseado em Honda et al., 1982)

	Banho termostatizado	**Estufa**
Diluição com água	100%	84%
Diluição com tampão	38%	35%

Através dos resultados apresentados é possível verificar que a determinação da actividade da endo-PG deverá ser executada, fazendo diluições do sobrenadante da fermentação com água destilada e fazendo a incubação dos tubos de digestão em banho-maria termostatizado.

Após a optimização das condições para determinação da actividade enzimática, foi necessário preparar as soluções constantes na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Reagentes usados para determinação da actividade enzimática usando o método descrito por Honda et al. (1982)

Solução	Composição	Preparação
Tampão citrato 0,1 M, pH=4,5	$C_6H_8O_7.H_2O$ $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$	Pesar 9,87658 g $C_6H_8O_7.H_2O$ e 15,5873 g $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$ para um balão de 1L; medir pH e se necessário corrigir com ácido ou base; guardar em frasco de vidro no frigorífico
Ácido poligalacturónico 0,1 % (p/V)	Ácido poligalacturónico	Pesar 1 g de ácido poligalacturónico; dissolver em tampão citrato 0,1 M pH=4,5, num balão de 1 L; perfazer o balão com tampão.
Ácido galacturónico (1591,5 mg/L)	Ácido galacturónico	Pesar 159,15 mg de ácido galacturónico; dissolver em água destilada num balão de 100 mL;
Tampão borato 0,004 M, pH=9,1	Tretaborato de sódio ($B_4Na_2O_7$)	Pesar 38,137 g de $B_4Na_2O_7.10H_2O$ (tetraborato de sódio deca-hidratado) e dissolver em 1 L água destilada (é necessário aquecer). depois de frio acertar o pH a exactamente 9,1; guardar em frasco de vidro escuro à temperatura ambiente.
Cianoacetamida 1 % (p/V)	Cianoacetamida	Pesar 5 g de cianoacetamida em 500 mL de água destilada; guardar em frasco de vidro escuro à temperatura ambiente.

O procedimento para dosear a actividade pelo método da cianoacetamida é semelhante ao descrito para o método de DNS. Assim, preparou-se 8 tubos de digestão por adição 490 μL de amostra a 350 μL de ácido poligalacturónico 0,1% (p/V) em tampão citrato 0,1 M, pH=4,5. Todos os tubos foram colocados em banho-maria a 40 ºC, e iniciou-se a contagem dos tempos. A cada 2,5 minutos retirou-se um tubo ao qual se adicionou 840 μL de solução de cianoacetamida e 1680 μL de tampão borato pH=9,1. Mergulhou-se os tubos em água a ferver durante 10 minutos. Parou-se a reacção mergulhando os tubos em água fria e após o arrefecimento, retirou-se 2,5 mL de cada tubo, para uma cuvete de quartzo, para ler a densidade óptica a 276 nm (foi usado como branco água destilada). Na calibração usou-se padrões de ácido galacturónico na gama 0,025-0,75 $g.L^{-1}$. A actividade é dada pelo declive da recta da zona linear em $U.mL^{-1}$. Uma unidade (U) de actividade enzimática por unidade de volume (mL) é expressa em micromoles de ácido galacturónico libertado por minuto por mililitro de solução de enzima ($U.mL^{-1}$)

3.2.2 Biomassa

A determinação da biomassa foi realizada medindo a densidade óptica (DO) das amostras a 620 nm num espectrómetro UV/Vis (modelo 7850, Jasco, Inc., EUA) e correlacionando estes valores com o peso das biomassa seca. O branco usado para estas determinações foi de água destilada. Na maioria das vezes as amostras tinham de ser diluídas com água destilada, de modo a que os valores encontrados da DO se encontrassem na zona linear da correlação (0,0 até 0,8 unidades de absorvância). As calibrações foram efectuadas para todas as fermentações realizadas.

3.2.3 Proteína

O doseamento da proteína foi efectuado por dois métodos.

Para obtenção dos resultados apresentados no capítulo 6 foi usado um kit (P 5656) comercializado pela Sigma e baseado no método de Lowry. Foi realizada uma diálise, a 4 ºC, do sobrenadante da fermentação contra água destilada

usando uma membrana de porosidade 25000 Da. Misturou-se 500 μL de reagente de Lowry a 500 μL de sobrenadante de fermentação após diálise. Esperou-se 20 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se rapidamente 250 μL de reagente de Folin Ciocalteu. Esperou-se 30 minutos à temperatura ambiente e leu-se a densidade óptica a 750 nm (todas as leitura foram concluídas em 30 minutos) contra um branco obtido por substituição do sobrenadante da fermentação por água destilada.

Nos restantes resultados o doseamento da proteína total fez-se em microplaca utilizando um kit (23236) comercializado por Pierce e baseado no método de Bradford (1976). Misturou-se em cada poço da microplaca 150 μl de amostra e 150 μl de reagente de Bradford, e leu-se densidade óptica a 595 nm contra um branco constituído por 150 μL de H_2O e 150 μL de reagente de Bradford.

Em ambos os métodos utilizados a curva de calibração de densidade óptica *versus* concentração de proteína é construída utilizando como padrão albumina do soro humano.

3.2.4 Açúcares Redutores

No doseamento dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (Miller, 1959). Para o efeito, adicionou-se, a 500 μL de amostra, 500 μL de reagente DNS (preparação em 3.2.1) e colocou-se em banho-maria a ferver durante 5 minutos. Após arrefecimento das amostras, adicionou-se 5 mL de água destilada e leu-se a densidade óptica a 540 nm. Como padrão utilizou-se o açúcar a dosear.

3.2.5 Sacarose, glucose e frutose

A concentração de sacarose, glucose e frutose foi determinada por cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC), usando um detector de índice de refracção (830-RI, Jasco, Japão). A amostra (20 μL) é filtrada (filtros 0,2 μm, Gelman Sciences, EUA) e injectada numa coluna Polyspher CH CA (Merck, Alemanha), aquecida a 80 ºC através de um forno com controlador de temperatura (Chrompack, Países Baixos) e eluída com uma solução de água

ultra-pura, desgasificada por ultra-sons. O caudal de eluente utilizado foi de 0,6 $mL.min^{-1}$ debitado por uma bomba 880-PU (Jasco, Japão). Foram efectuadas, periodicamente, curvas de calibração com soluções dos vários açúcares de concentração conhecida.

3.3 SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

3.3.1 Reagentes utilizados nos SDFA

Os reagentes usados para os sistemas de duas fases aquosas são provenientes de várias origens (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 Reagentes utilizados nos sistemas de duas fases aquosas e respectiva origem

Reagente	Origem
PEG4000, 8000 e 20000	Promega Corporation (Madison, WI, EUA)
$(NH_4)_2SO_4$	Merck
Fosfato de potássio	Merck
Ucon 50-HB-5100 (M_n = 3930)	Union Carbide (Nova Iorque, EUA)
PVA, M_n = 10000, 88 % hidrolisado	Scientific Polymer Products (Nova Iorque, EUA)
Reppal PES100, M_n = 10000	REPPE AB, Suécia
Ligantes (Navy H-ER 150, Yellow MX-3R, Yellow H-E4R, Navy MX-4RD)	ZENECA (Inglaterra)
Ligantes (Royal Blue E-FR, Navy Blue E-BNA, Red E-3RN)	BAYER (Alemanha)

Todos os reagentes foram usados sem qualquer purificação adicional.

Os ligandos foram obtidos e caracterizados conforme 3.3.2.

Foram previamente preparadas soluções de reserva de alguns dos reagentes utilizados, cujas concentrações foram expressas em % (p/p). Deste modo, as

concentrações das soluções preparadas foram: PEG – 40 % ou 50 %, sal - 40 %, PVA10000 – 30 % e Reppal PES100 - 40 %.

A solução de reserva de Reppal PES100 foi preparada da seguinte forma: adicionou-se, a um frasco de vidro, quantidades conhecidas de polímero e água, e manteve-se a mistura em agitação por meio de um agitador magnético, à temperatura ambiente, até dissolução completa do polímero. Adicionou-se água até perfazer a concentração final desejada (40 % p/p).

Para a preparação da solução de reserva de PVA, com cerca de 30 % (p/p), adicionou-se, por duas vezes, água em ebulição, e a agitação foi efectuada com o auxílio de uma vareta, num banho de água termostatizado, a cerca de 90 ºC. Após a obtenção de uma mistura homogénea, adicionou-se água quente até obter a concentração final desejada, agitou-se durante cerca de meia hora com um agitador magnético e com o frasco fechado, e deixou-se estabilizar à temperatura ambiente.

As soluções de sal – 40 % e PEG – 40 % ou 50 % foram preparadas por dissolução dos respectivos reagentes em água destilada.

As soluções de reserva dos polímeros foram armazenadas, à temperatura ambiente, para utilização em ensaios posteriores.

3.3.2 Ligandos

Os 7 ligandos (Procion Navy H-ER 150, Procion Yellow MX-3R, Procion Yellow H-E4R, Procion Navy MX-4RD, Levafix Royal Blue E-FR, Levafix Navy Blue E-BNA, Levafix Red E-3RN) (ensaios descritos no capítulo 6) foram previamente fixados ao PEG por Venâncio (1996). Os comprimentos de onda máximo obtidos para cada um deles encontram-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Ligandos utilizandos nos SDFA e respectivos comprimentos de onda máximos

Ligando	λ_{max} / nm	K_I
Procion Navy H-ER 150	610	550
Procion Yellow MX-3R	415	476
Procion Yellow H-E4R	415	694
Procion Navy MX-4RD	610	612
Levafix Royal Blue E-FR	615	385
Levafix Navy Blue E-BNA	605	841
Levafix Red E-3RN	500	745

3.3.3 Equipamento utilizado nos SDFA

Para determinação do equilíbrio líquido-líquido, os diferentes SDFA foram preparados em ampolas de decantação de 50 mL da LMS. Os ensaios realizados para determinação de partição da enzima e proteínas em cada uma das fases foram executados em tubos de 1,5 mL.

3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248–254. 1976.

Honda, S., Nishimura, Y., Takahashi, M., Chiba, H., Kakehi, K. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry*. 119, 194-199. 1982.

Patching, J. W. e Rose, A. H. The effects and control of temperature. Em: Methods in Microbiology. Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (eds). Academic Press, London. Vol 2, pág. 23-38. 1969.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31, 426-428. 1958.

Schwan, R. e Rose, A. H., Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. J*ournal of Applied Bacteriology*. 76, 62-67. 1994.



Capítulo 4

Selecção das estirpes de *K. marxianus* e caracterização da enzima

85	4	Selecção das estirpes de *K.marxianus* e caracterização da enzima
87	4.1	Introdução
88	4.2	Materiais e Métodos
88	4.2.1	Estirpes utilizadas
89	4.2.2	Fermentações
89	4.2.3	Caracterização da enzima endo-PG do sobrenadante da fermentação
90	4.2.4	Determinação da estabilidade da enzima em função da temperatura
91	4.2.5	Métodos analíticos
91	4.3	Resultados
91	4.3.1	Selecção de estirpes de *K. marxianus* utilizando glucose e sacarose como fonte de carbono
94	4.3.2	Efeito das condições de aerobiose ou anaerobiose na produção da enzima
95	4.3.3	Caracterização da enzima endo-PG do sobrenadante da fermentação
100	4.3.4	Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas
101	4.4	Conclusões
102	4.5	Referências bibliográficas

Neste capítulo fez-se a selecção de entre várias estirpes de *Kluyveromyces marxianus* aquelas que apresentam maior produção em termos de actividade enzimática. Para tal é usado um meio sintético variando apenas a principal fonte de carbono: glucose ou sacarose. As estirpes CH4-1, CH0-1 e CCT3172 foram as seleccionadas para a produção da enzima usada nos ensaios de partição e separação.

Estudou-se, também, o efeito das condições de aerobiose e anaerobiose na produção da enzima endo-PG para a estirpe CCT 3172 crescida em meio com glucose. Em termos de produção de enzima verificou-se que se obtinham melhores resultados quando apenas era usada a agitação mecânica.

Posteriormente, realizaram-se ensaios para avaliar a massa molecular da endo-PG produzida pelas estirpes acima referidas. Em todos os casos verificou-se que a massa molecular era cerca de 33 kDa. Foi possível, também, verificar que nas estirpes CCT 3172 e CH4-1 cerca de 50 % da proteína total excretada correspondia à endo-PG e no caso da estirpe CH0-1, 80 % da proteína total correspondia à enzima pretendida.

Por último, foi estudada a estabilidade da enzima a diferentes temperaturas. Verificou-se que à temperatura ambiente a endo-PG mantém a mesma actividade durante aproximadamente uma semana.

4.1 INTRODUÇÃO

A produção de cacau requer a fermentação natural dos grãos de cacau. As leveduras predominam na fase inicial da fermentação (Schwan e Rose, 1994) quando a maior parte da polpa que circunda os grãos é degradada. A polpa de cacau contém cerca de 14 % de açúcar e 1,5 % de pectinas. Durante a fermentação do cacau aparecem naturalmente estirpes de leveduras capazes de excretar pectinases (Schwan e Rose, 1994). As estirpes do género *Kluyveromyces marxianus* isoladas da fermentação do cacau, são das melhores produtoras de endo-PG (Schwan *et al.*, 1997) assim como o género *Kluyveromyces wickerhamii* (Silva et al., 2005).

As pectinases são de grande importância na indústria de bebidas devido à sua capacidade para aumentar a extracção e clarificação dos sumos de fruta concentrados e também na indústria de processamento de vegetais, na produção de vinho, na extracção de azeite e na fermentação de chá, café e cacau.

Em termos industriais a enzima endo-PG é obtida a partir da fermentação do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Este fungo excreta uma grande variedade de pectinases tais como a pectinesterase (PE), poligalacturonase (PG) e pectinaliase (PL) (Fogarty, 1983) e outros metabolitos que dificultam a etapa de separação (Harsa *et al*. 1993). A acção da enzima PE ao actuar sobre as pectinases produz metanol que é tóxico.

Por outro lado, existem alguns casos específicos em que uma solução com altos níveis de poligalacturonase é desejada. A enzima endo-PG promove a redução da viscosidade da polpa de cacau, mas as leveduras capazes de produzir esta enzima não a produzem em quantidade suficiente para garantir a redução rápida da polpa, que é essencial para produzir chocolate de melhor qualidade (Schwan e Wheals, 2004). Torna-se então necessário adicionar enzima purificada para que fermentações potencialmente pobres (com muita polpa) se tornem em fermentações com bons rendimentos.

As PG são também usadas no processamento de comida de bebé para a tornar mais digerível e também para estabilizar a cor no sumo de laranja.

Assim, as leveduras tornam-se uma alternativa para a produção em grande escala de enzimas (Blanco et al, 1994; 1999). As leveduras, quando comparadas com os fungos filamentosos, possuem algumas vantagens, entre as quais: são unicelulares, o crescimento é relativamente simples e por outro lado através da manipulação genética é possível aumentar a produção de enzima de modo a tornar o processo rendível industrialmente (Jia e Wheals, 2000). Este conjunto de factores faz com que as leveduras sejam uma alternativa para a produção em grande escala de enzimas (Blanco et al, 1994; 1999).

De acrescentar, também, que na maioria dos casos as leveduras não excretam PE, e assim as suas pectinases podem ser usadas nos processos referidos anteriormente sem que haja a libertação de metanol (Schwan e Wheals, 2004; Fernández-González et al., 2004).

Neste capítulo utilizam-se leveduras do género *K. marxianus* isoladas da fermentação do cacau para produzir a enzima endo-poligalacturonase. São usadas duas fontes de carbono, glucose ou sacarose, e o objectivo é seleccionar as melhores produtoras de enzima e posteriormente determinar o peso molecular da mesma. É também avaliada a proporção de enzima endo-PG excretada em relação à quantidade de proteína total. Por último avalia-se a estabilidade da enzima a diferentes temperaturas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Estirpes utilizadas

As estirpes de levedura *Kluyveromyces marxianus* usadas no decorrer deste trabalho foram fornecidas pela Universidade Federal de Lavras. Após a recepção procedeu-se ao armazenamento das leveduras conforme descrito em 3.1.2.

As estirpes de *Klyveromyces marxianus* utilizadas foram as seguintes: CH4-1, CH5-1, CH5-3, CH5-4, CH9-1, CH1-1, CH0-1, CH8-1, CH2-2, CH8-9 e CCT 3172.

4.2.2 Fermentações

As fermentações realizadas para seleccionar as estirpes com maior capacidade para produzir a enzima endo-PG, foram efectuadas conforme descrito em 3.1.3 "Fermentações descontínuas em balões Erlenmeyer ou frascos rolhados ou reactor de 2L", usando-se os frascos rolhados para a selecção das estirpes (secção 4.3.1) e o reactor de 2 L para avaliar o efeito do oxigénio (secção 4.3.2). A composição do meio de fermentação, adaptado de Patching e Rose (1969) foi a seguinte: 10,0 $g.L^{-1}$ glucose ou 10,0 $g.L^{-1}$ sacarose, 1,0 $g.L^{-1}$ extracto de levedura, 3,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 4,5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0,25 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$ e 0,25 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$ (conforme descrito em 3.1.3). Ajustou-se o pH a 5 com NaOH.

4.2.3 Caracterização da enzima endo-PG do sobrenadante da fermentação

Para avaliar a massa molecular da enzima endo-PG presente no sobrenadante da fermentação foi usada a técnica FPLC (fast protein liquid chromatography) com uma coluna para filtração em gel. A percentagem de enzima presente no sobrenadante foi investigada utilizando a filtração em gel e a troca iónica.

Para a filtração em gel foi utilizada uma coluna "sephacryl S60 HR" (60 cm × 1,6 cm) (Pharmacia, Suécia) que foi equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH=5,0 e dextrano azul a um caudal de 0,5 $mL.min^{-1}$. Com esta lavagem verificou-se o enchimento e determinou-se o tempo e volume de lavagem da coluna, sendo t_{lav}= 70 min e V_{lav}=35 mL.

De seguida procedeu-se à calibração da coluna utilizando, para tal, uma solução com ribonuclease A (M=13,7 kDa), quimotripsinogeneo (M=25,0 kDa), ovalbumina (M=45,0 kDa) e albumina do soro bovino (M=66,0 kDa).

As amostras foram injectadas na coluna e, a cada 3 minutos, foram recolhidos 1,5 mL de solução para determinação da proteína (ver 3.2.3) e da actividade

enzimática da endo-PG (ver 3.2.1). O perfil de saída da proteína foi observado no detector UV (λ=280 nm) acoplado ao aparelho de FPLC.

As amostras de enzima cuja caracterização foi efectuada por filtração em gel foram obtidas de 3 fontes: fermentação em meio contendo 10 $g.L^{-1}$ de glucose, utilizando as estirpes CCT 3172 ou CH4-1, fermentação em meio contendo 10 $g.L^{-1}$ de sacarose usando a estirpe CH0-1. A restante composição do meio é igual à descrita em 3.1.3.

Antes da injecção no injector da coluna, as amostras foram concentradas utilizando a diálise com uma de membrana de 14000 Da de porosidade contra PEG 20000 ou usando um SDFA de composição 25 % PEG8000-5,2 % $(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC ou de composição 27 % Ucon-2,2 % $(NH_4)_2SO_4$ a 30 °C.

Depois de preparada a amostra, foram injectados 0,5 mL de solução de enzima concentrada.

Na troca iónica foi usada uma coluna de dimensões 20 cm×1,6 cm. A coluna estava empacotada com o gel CM-Sepharose e foi equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH=4,5 (tampão A) e eluída com um tampão B (tampão A com 0,3 M NaCl) a um caudal de 1,0 $mL.min^{-1}$.

Foram injectados 10 mL de amostra do sobrenadante da fermentação pela estirpe CCT 3172, no meio descrito em 3.1.3 após diálise, em membrana de 14000 Da, contra água destilada a 5 ºC.

4.2.4 Determinação da estabilidade da enzima em função da temperatura

Para determinação da estabilidade da enzima ao longo do tempo e para diversas temperaturas, recolheu-se o sobrenadante da fermentação realizada com 10 $g.L^{-1}$ de glucose e com a estirpe CCT 3172. O sobrenadante foi dividido em seis porções que se colocaram em tubos de vidro às diferentes temperaturas (22, 30, 40, 45, 50, 60 ºC) em banho-maria termostatizado. Ao longo do tempo foram retiradas amostras e determinada a sua actividade enzimática.

4.2.5 Métodos analíticos

As quantificações da biomassa, glucose, lactose, actividade enzimática e proteínas foram efectuadas conforme descrito em 3.2.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Selecção de estirpes de *K. marxianus* utilizando glucose e sacarose como fonte de carbono

Para seleccionar as estirpes melhores produtoras de enzima foram utilizadas duas fontes de carbono: glucose ou sacarose.

Nos ensaios com glucose como fonte de carbono foram testadas 10 estirpes de *K. marxianus* (CH4-1, CH5-1, CH5-3, CH5-4, CH9-1, CH1-1, CH0-1, CH8-1, CH2-2 e CCT 3172), enquanto que para a selecção utilizando sacarose foram testadas 8 estirpes (CH4-1, CH5-1, CH5-3, CH9-1, CH0-1, CH8-1, CH2-2 e CCT 3172).

A Figura 4.1 representa os perfis encontrados para o consumo de substrato, produção de endo-PG e produção de biomassa usando a estirpe CCT 3172 em glucose e em sacarose, respectivamente.

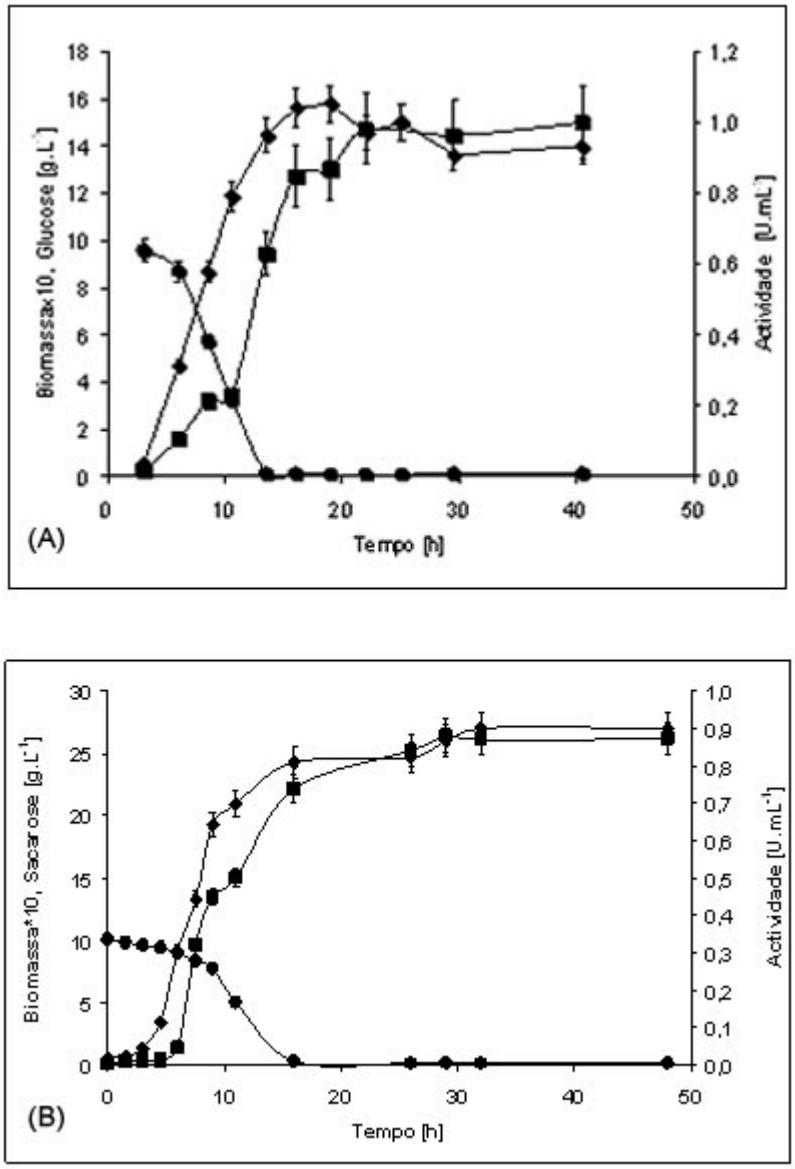


Figura 4.1 Perfis de produção de biomassa, enzima e consumo de substrato para a estirpe CCT 3172, usando como fonte de carbono glucose (A) e sacarose (B). Biomassa (◆), actividade endo-PG (■) e consumo de substrato (●).

Os perfis encontrados para as restantes estirpes são semelhantes aos encontrados para a estirpe CCT 3172. Verifica-se que a excreção da enzima endo-PG está associada ao crescimento exponencial, não existindo nenhum incremento após a fase estacionária.

Os resultados mais significativos encontram-se sumariados na Tabela 4.1. As amostras foram recolhidas após 14 h de fermentação para o caso em que se utilizou glucose como fonte de carbono e após 16 horas quando foi utilizada sacarose.

Tabela 4.1 Concentração de biomassa e actividade enzimática para as estirpes testadas, usando a glucose (após 14 h de fermentação) e sacarose (após 16 horas de fermentação) como fonte de carbono

	Biomassa ($g.L^{-1}$)		Actividade ($U.mL^{-1}$)	
Estirpes	**Glucose**	**Sacarose**	**Glucose**	**Sacarose**
CH4-1	1,3	2,4	1,52	1,53
CH5-1	1,4	2,6	1,22	1,30
CH5-3	1,4	2,5	1,10	1,44
CH5-4	1,3	n.d.	0,79	n.d.
CH9-1	1,4	2,4	1,26	1,66
CH1-1	1,6	n.d.	0,86	n.d.
CH0-1	1,5	2,5	0,94	1,83
CH8-1	1,5	1,9	0,92	0,96
CH2-2	2,0	2,5	0,94	1,56
CCT 3172	1,6	2,4	1,00	0,80

Tendo em consideração que o coeficiente de variação para a determinação da biomassa é de 5 % e analisando os resultados presentes na Tabela 4.1, estes mostram que a formação de biomassa é superior quando é utilizada como fonte de carbono a sacarose. Para a estirpe CCT 3172 (quando a sacarose é utilizada, a biomassa formada é 50 % superior), encontra-se um resultado diferente ao encontrado por Schwan e Rose (1994) que obtiveram o mesmo valor para a biomassa formada, independentemente da fonte de carbono.

Relativamente à produção de endo-PG (o coeficiente de variação da actividade enzimática foi determinado e obteve-se o valor de 10 %), os resultados mostram que a produção é superior quando a sacarose é utilizada como fonte de

carbono, excepto para a estirpe CCT3172. A estirpe CH0-1 produz cerca do dobro na presença de sacarose, a estirpe CH2-2 mais cerca de 65 % e as estirpes CH9-1 e CH5-3 aproximadamente mais 30 %. Em relação à estirpe CCT 3172 os resultados são semelhantes aos obtidos por Schwan e Rose (1994), em que também existia uma ligeira maior produção de enzima quando a levedura degrada a sacarose.

Dos resultados acima seleccionou-se as estirpes CH0-1 para produção da enzima em melaço de cana e sacarose (ver capítulo 7), e as estirpes CCT 3172, CH0-1 e CH4-1 para produção da enzima em glucose (ver capítulos 6 e 7).

4.3.2 Efeito das condições de aerobiose ou anaerobiose na produção da enzima

Para avaliar quais as melhores condições para maximização da produção de enzima foram realizadas experiências em condições de anaerobiose (por injecção de azoto gasoso, 0,79 $L.min^{-1}$), aerobiose (por injecção de ar comprimido, 0,83 $L.min^{-1}$ e 0,98 $L.min^{-1}$) e também sem arejamento.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Efeito das condições de aerobiose ou anaerobiose na conversão de glucose a biomassa ($Y_{(X/S)}$), na conversão de glucose a endo-PG ($Y_{(PG/S)}$), na actividade específica (Act. Esp.) e na produtividade em endo-PG (Q_{PG})

	Caudal ($L.min^{-1}$)			
	N_2 – 0,79	**Sem ar**	**Ar – 0,83**	**Ar – 0,98**
μ (h^{-1})	0,2	0,4	0,5	0,6
$Y_{(X/S)}$ ($g_{biomassa}.g^{-1}_{glucose}$)	0,04	0,11	0,21	0,24
$Y_{(PG/S)}$ ($U.g^{-1}_{glucose}$)	62,6	79,5	28,9	21,8
Act. Esp. ($U.mg^{-1}_{proteína}$)	0,105	0,174	0,053	0,046
Q_{PG} ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)	0,011	0,105	0,040	0,031

Pelos resultados apresentados verifica-se que a taxa de conversão do substrato em biomassa é tanto maior quanto mais elevada a concentração de oxigénio fornecida. Por outro lado verifica-se que em termos de produção de enzima, obteve-se maiores rendimentos e maior produtividade quando somente existia agitação mecânica (não era efectuado nenhum arejamento) de acordo com o que foi obtido previamente por Schwan e Rose (1994). A melhor condição, em termos de rendimento de produção de endo-PG, foi obtida quando era introduzido azoto no meio de fermentação. Contudo, em termos de produtividade este valor torna-se muito baixo devido à reduzida taxa específica de crescimento que se verifica nesta condição. Assim, a condição óptima para a produção de enzima será quando se utiliza somente a agitação mecânica.

4.3.3 Caracterização da enzima endo-PG do sobrenadante da fermentação

Os resultados obtidos para caracterização da enzima por FPLC estão apresentados na Tabela 4.3 e na Figura 4.1.

Como se pode verificar pela análise da Tabela 4.3, quase toda a actividade enzimática é recolhida num único pico cujo intervalo de retenção varia entre os 100 e 125 minutos, e o máximo de absorvância está localizada entre os 108 e 115 minutos (com um valor médio de 111 min), que permite determinar o massa molecular da enzima como 33 kDa. Concomitantemente à determinação da massa molecular da enzima, a recuperação da proteína no pico também indica a percentagem de enzima na proteína total existente no sobrenadante de fermentação. Para o sobrenandante da fermentação utilizando a estirpe CCT 3172, cerca de 52 % da proteína total corresponde à enzima endo-PG, para o sobrenadante da fermentação com a estirpe CH4-1, 54 % da proteína total é a enzima, e para o caso da estirpe CH0-1 crescida em sacarose, mais de 80 % da proteína total é enzima. Atendendo à existência de erros sistemáticos na recolha das fracções foi determinado um erro médio de 10 % nos resultados obtidos anteriormente.

Tabela 4.3 Tempo de retenção (t_r) e tempo de lavagem (t_{lav}) para as soluções de enzima analisadas por FPLC; massa molecular (M) obtida para a enzima endo-PG

Estirpe	Fonte carbono	t_r/ t_{lav} (min)	M (kDa)
CH4-1	10 g.L^{-1} glucose	108,51 / 70,29	35,9
CCT 3172	10 g.L^{-1} glucose	111,10 / 69,90	32,5
CH0-1	10 g.L^{-1} sacarose	114,51 / 70,00	29,1
Fungos	n.d.	I – 96,25 / 70,02 II – 107,91 / 70,02	I – 53,6 II – 36,3

Paralelamente, foi analisada uma solução de endo-PG produzida por fungos filamentosos, Pectinex Ultra SP-L (Novozymes, Dinamarca). A actividade enzimática foi encontrada em dois picos: o primeiro pico com tempo de retenção entre 90 e 102 min, e o segundo com tempo de retenção entre 102 e 114 min.

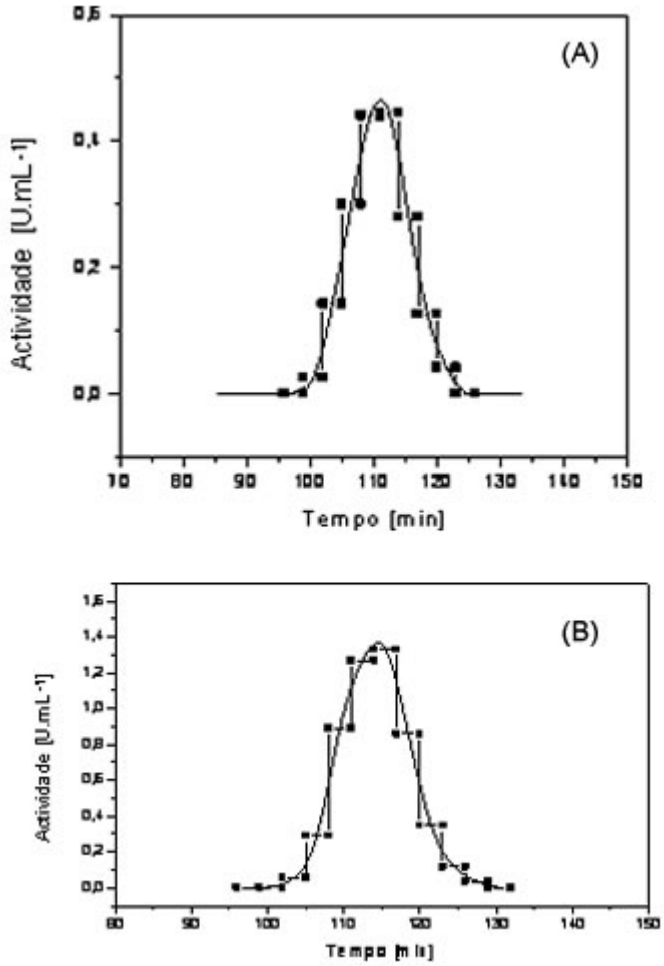


Figura 4.2 Perfis de actividade enzimática. (A) enzima produzida pela estirpe K. marxianus CCT 3172, (B) enzima produzida pela estirpe *K. marxianus* CH0-1. Actividade enzimática obtida nas porções recolhidas cada 3 minutos (■—■).

Os resultados da separação da enzima para as várias soluções estão sumariados na Tabela 4.4

Tabela 4.4 Resultados obtidos através da filtração em gel para caracterização da enzima produzida por CH4-1, CCT 3172, CH0-1 e presente num complexo comercial (Pectinex Ultra SP-L, Novozymes, Dinamarca).

Sobrenadante da fermentação					**Solução de enzima concentrada pelo método indicado**				**Após filtração em gel (recuperação de enzima nos tempos de retenção entre 100 e 125 min)**	
Estirpe	**Substrato ($g.L^{-1}$)**	**V (mL)**	**Actividade (U)**	**Proteína (mg)**	**Método**	**Volume (mL)**	**Recup. Endo-PG**	**Recup. Proteína**	**Recup. Endo-PG**	**Recup. Proteína**
CH4-1	10,Glucose	8,8	16,3	0,106	Diálise	0,5	> 98,0 %	n.d.	97,8 %	54,0 %
CCT3172	10,Glucose	2,5	2,75	0,0228	SDFA	0,5	98,3 %	77,2 %	98,9 %	52,0 %
CH0-1	10,Sacarose	2,2	7,70	0,0440	SDFA	0,5	97,6 %	78,8 %	100,0 %	79,0 %
Fungo	n.d.	0,5	41,0	5,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86,7 % *	54,2 % *

* Os resultados são obtidos para 2 picos cujos tempos retenção variam entre 90 e 102 min, e entre 102 e 114 min.

A percentagem de enzima presente no sobrenadante de fermentação foi também confirmada por troca iónica e comparada com o resultado obtido por Harsa et al. (1993). Após injectar na coluna 10 mL do sobrenadante da fermentação dializado, as proteínas que não ficaram retidas no gel foram removidas por lavagem da coluna com o tampão A. Não foi encontrada actividade enzimática nesta solução de lavagem. A fracção de sobrenadante que ficou retida na coluna de troca iónica foi eluída com 50 % de tampão B e posteriormente com 100 % de tampão B. O liquido eluído foi recolhido para doseamento da actividade e proteína total. Na Tabela 4.5 estão presentes os resultados obtidos e comparados com os obtidos por Harsa et al. (1993).

Tabela 4.5 Resultados obtidos na purificação da enzima endo-PG por troca-iónica

Etapa de purificação	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Recup. Proteína (%)	Act. Total (U)	Recup. enzima (%)	Factor de purificação total
Sobrenadante fermentação	8,33	0,0758	100	26,49	100	
Diálise	10,0	0,0553	73,0	26,40	99,7	
Troca-iónica	11,0	0,0310	40,9	25,44	96,0	2,3
Sobrenadante fermentação *	519	1878,8	100	404,8	100	
Troca-iónica *	89,5	5,4	0,29	383,7	94,9	327

* Resultados obtidos por Harsa et al. (1993).

Pela análise dos resultados verifica-se que toda a actividade enzimática (> 95%) é recolhida num só pico e obteve-se um factor de purificação de 2,3, enquanto que Harsa et al. (1993) obteve um valor de 327. Este facto é atribuído à elevada percentagem de enzima no sobrenadante da fermentação (cerca de 40 %) Estes resultados estão de acordo com os obtidos por filtração em gel para a mesma estirpe CCT 3172 (52 %).

4.3.4 Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas

Foram realizados ensaios para testar a estabilidade da enzima a diferentes temperaturas. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4.3

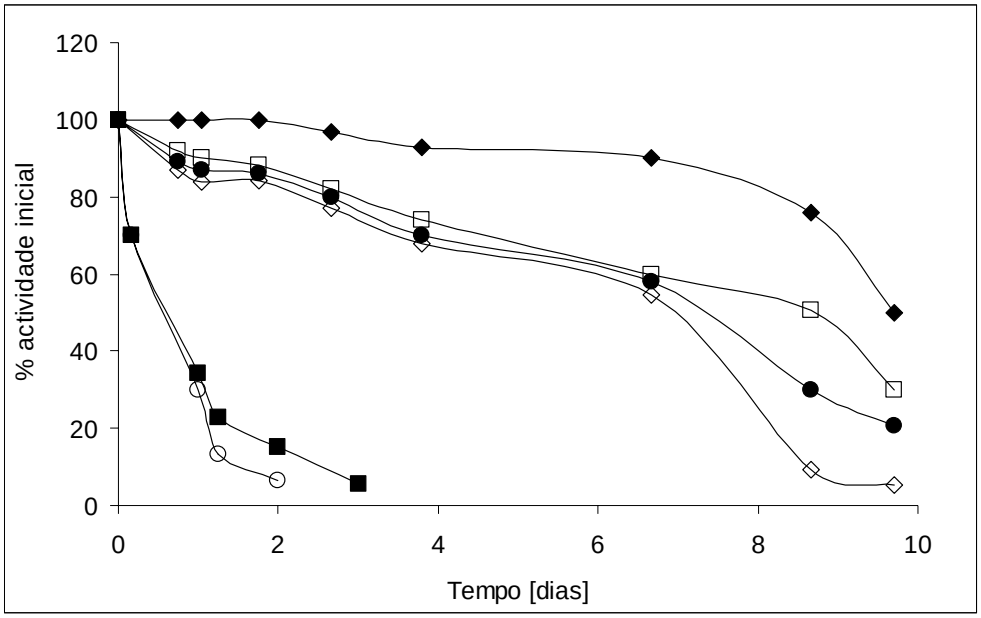


Figura 4.3 Perfis de variação da actividade da endo-PG ao longo do tempo para diversas temperaturas. 22 ºC (◆); 30 ºC (□); 40 ºC (●); 45 ºC (◇); 50 ºC (■), 60 ºC (○).

Verifica-se, pela análise da Figura 4.3 que há perda da actividade enzimática com o aumento da temperatura da solução em que a enzima é mantida. Para a temperatura de 22ºC a actividade enzimática mantém-se constante até cerca do 7º dia (aos 6, 7 dias houve uma perda da actividade de 1 %), enquanto que para temperaturas de 30, 40 e 45 ºC existem perdas da ordem dos 40 % até aos 6, 7 dias, verificando-se a partir daí perdas mais acentuadas, nomeadamente para as soluções conservadas às temperaturas de 40 e 45 ºC. Para as soluções conservadas a temperaturas de 50 e 60 ºC, verifica-se uma queda abrupta do valor da actividade enzimática logo após 4 horas do término da fermentação e colocação do sobrenadante contendo enzima às temperaturas respectivas.

Estes resultados permitem concluir que colocando o sobrenadante da fermentação à temperatura de 22 ºC, o valor da actividade não é significativamente alterado.

4.4 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu avaliar a produção de endo-PG, utilizando duas fontes de carbono, a glucose e a sacarose, com leveduras isoladas da fermentação do cacau. Para as várias estirpes utilizadas e para ambas fontes de carbono confirma-se que a produção da enzima está estritamente relacionada com o crescimento, confirmando os resultados obtidos por Schwan e Rose (1994) para a estirpe *K. marxianus* CCT 3172 e por Wimborne e Rickard (1978) para outras estirpes do género *K. marxianus*.

Em todos os casos verificou-se que a fonte de carbono desempenha um papel importante na formação de biomassa e na produção de enzima. A biomassa formada é mais elevada quando a sacarose é utilizada e em termos de produção de enzima verificou-se que a melhor produtora utilizando a sacarose como fonte de carbono é a estirpe CH0-1, quando utilizada a glucose é a estirpe CH4-1. A estirpe CCT 3172 apresenta-se como a terceira melhor produtora quando é usada a glucose e quinta melhor produtora quando utilizada a sacarose.

A presença de oxigénio ou a sua ausência (quer por injecção de azoto gasoso, quer por apenas existir agitação mecânica) revelou-se também um parâmetro importante a controlar. Assim, verificou-se que a produtividade máxima de enzima, utilizando a estirpe CCT 3172, ocorre na ausência de oxigénio quando é utilizado somente agitação mecânica para a mistura do meio fermentativo, de acordo com o encontrado por Beaven et al. (1982) e por Schwan e Rose (1994).

A massa molecular da enzima foi determinada por filtração em gel e foi encontrado o valor de 33 kDa, conforme também verificado por Schwan et al. (1997), para a estirpe CCT 3172. Barnby et al. (1990) encontrou valores ligeiramente superiores, cerca de 49 kDa, para uma estirpe *K. marxianus* NCYC 587.

Por filtração em gel e por troca iónica verificou-se que a percentagem de enzima endo-PG no sobrenadante da fermentação da estirpe CCT 3172 era de 52 % e 40 % respectivamente. Para as estirpes CH4-1 e CH0-1 obteve-se, por filtração em gel, os valores de 54 % e 79 %. Estes resultados permitem concluir

que o sobrenadante de fermentação possui elevados teores de enzima em relação à proteína total, contrariamente ao obtido por Harsa et al. (1993) também com a levedura *K. marxianus*, o que vai resultar em valores baixos de factor de purificação quando a enzima é separada por partição bifásica aquosa (capítulos 6 e 7).

Por último, a enzima endo-poligalacturonase mostra-se sensível à temperatura. A uma temperatura de 22 ºC a endo-PG permanece activa durante cerca de uma semana, enquanto que para temperaturas de 50 e 60 ºC há uma queda abrupta da actividade enzimática logo após o primeiro dia.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnby, F. M., Morpeth, F. F. e Pyle, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus.* I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 12, 891-897. 1990.

Beaven, M. J., Charpentier, C. e Rose, A. H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipids fatty-acyl composition in Saccharomyces cerevisiae NCYC 431. *Journal of General Microbiology*. 128, 1447-1455. 1982.

Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A. e Villa, T.G. Production of an endopolygalacturonase from Saccharomyces cerevisiae. *Canadian Journal of Microbiology*. 40, 974–977. 1994.

Blanco, P., Sieiro, C. e Villa, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 175, 1-9. 1999.

Fernández-González, M., Úbeda, J. F., Vasudevan, T.G., Cordero Otero, R.R. e Briones, **A.I.** Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology Letters*. 237 (2), 261-266. 2004.

Fogarty, W.M. e Kelly, C.T. Pectic enzymes Em: Microbial Enzyme and Biotechnology (Fogarty, W.M., Ed.), pág. 131–182. Applied Science Publishers, London, UK. 1983.

Harsa, S., Zaror, C.A. e Pyle, D.L. Production of polygalacturonases from Kluyveromyces marxianus fermentation: preliminary process design and economics. *Process Biochemistry*. 28,187–195. 1993.

Jia, J.H. e Wheals, A. Endopolygalacturonase genes and enzymes from Saccharomyces cerevisiae and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetic*. 38, 264–270. 2000.

Patching, J. W., e Rose, A. H. The effects and control of temperature. Em: Methods in Microbiology. Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (eds). Vol2 pág 23-38. London. Academic Press. 1969.

Schwan, R. e Rose, A. H., Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. J*ournal of Applied Bacteriology*. 76, 62-67. 1994.

Schwan, R. F., Cooper, R. M. e Wheals, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. 21, 234-244. 1997.

Schwan, R.F. e Wheals, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44, 205–222. 2004.

Silva, E. G., Borges, M. F., Medina, C., Piccoli, R. H. e Schwan, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*. 5 (9), 859-865. 2005.

Wimborne, M. P. e Rickard, A. D. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* in controlled environments. *Biotechnology and Bioengineering*. 20, 231-242. 1978.



Capítulo 5

Determinação de diagramas de fases

105	5	Determinação de diagramas de fases
107	5.1	Introdução
108	5.2	Materiais e Métodos
108	5.2.1	Reagentes
108	5.2.2	Determinação dos dados de equilíbrio liquido-liquido
109	5.2.3	Métodos analíticos
110	5.3	Resultados
110	5.3.1	Sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$
115	5.3.2	Sistema Ucon-PVA e Ucon-Reppal PES 100
118	5.3.3	Sistema PEG 8000 – PVA 10000
119	5.4	Conclusões
120	5.5	Referências bibliográficas

Os diagramas de fases para os sistemas Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, Ucon-PVA10000, Ucon-Reppal PES100 e PEG8000-PVA10000 foram determinados à temperatura de 22 °C. Para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ foram também determinados os diagramas de fases a 30 e 40 °C. Para determinar o declive de cada linha de ligação foi efectuada uma regressão linear e foi também calculado o desvio padrão para os declives da linha de ligação associados a cada diagrama de fases.

Os desvios padrão são, para a maioria das linha de ligação inferiores a 0,1 e os declives de cada linha de ligação para cada diagrama variam em cerca de 5,5 % em torno do valor médio para todos os casos, excepto para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 40 °C. Os diagramas de fases para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ obtidos para as diferentes temperaturas mostram necessitar de concentrações de sal e polímero inferiores aos sistemas convencionais. Por outro lado, como ocorre inversão de fases dependendo da temperatura de operação e o polímero usado é termossensível, estes sistemas são bastante atractivos e versáteis. Os diagramas de fases obtidos para os sistemas Ucon-PVA e Ucon-Reppal PES100 são muito semelhantes uma vez que ambos necessitam de concentrações elevadas de polímero (PVA ou Reppal PES100) para formar as duas fases.

5.1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de duas fases aquosas são muitas vezes usados para separação de biomoléculas (Kula et al., 1982; Albertsson, 1986). Existem duas classes de SDFA: os que são constituídos por dois polímeros e os que são constituídos por um polímero e um sal. Os polímeros podem ser termossensíveis.

O sistema polímero-sal é bastante usado em extracções quer laboratoriais quer em grande escala (Kula et al., 1982; Veide et al., 1984). Neste tipo de sistemas a partição deve-se ao *salting out* das proteínas de uma das fases.

De entre os SDFA constituídos por dois polímeros, o sistema PEG-dextrano é o mais estudado, e tem sido muito usado para caracterizar o mecanismo de partição das biomoléculas (Albertson, 1986; Zaslavsky, 1995). Um outro SDFA também muito usado é o PEG-hidroxipropil amido (comercialmente conhecido como Reppal PES100) (Zaslavsky, 1995; Sturesson et al., 1990; Venâncio et al., 1993). Os resultados obtidos com estes tipos de sistemas são muito semelhantes, mas os derivados de amido apresentam a vantagem de diminuir os custos de operação.

Os polímeros termossensíveis em solução formam um sistema de duas fases aquosas quando colocados acima do ponto de turvação ("cloud point temperature - CPT"). Entre estes, os copolímeros de óxido de etileno e óxido de propileno (EOPO) têm sido utilizados na separação de proteínas (Johansson, 1995; 1998). Estes tipos de polímeros podem ser um substituto do PEG e apresentam como vantagens o facto de poderem ser facilmente recuperáveis devido às suas características termossensíveis (Alred et al., 1992; Persson et al., 1998).

Os copolímeros de EOPO podem ser introduzidos nos sistemas convencionais constituídos por dois polímeros ou por um polímero e um sal, conduzindo a um vastíssimo conjunto de SDFA. Estes SDFA têm características mais atractivas

que os SDFA tradicionais, uma vez que, devido às suas características termossensíveis, se pode reutilizar o polímero.

Uma vez que nos capítulos 6 e 7 são efectuados ensaios de partição e separação para a enzima endo-PG utilizando SDFA, neste capítulo são determinados os diagramas de fases de alguns dos SDFA utilizados nos capítulos acima referidos. O Ucon 50-HB-5100, que é um copolímero aleatório constituido por 50 % de óxido de etileno e 50 % de óxido de propileno com uma massa molecular média de 3900 Da é utilizado para formar um SDFA com os seguintes compostos: $(NH_4)_2SO_4$, polivinil álcool (PVA10000) e hidroxipropil amido (Reppal PES100) e para cada um deles é determinado o diagrama de fases. É também apresentado o diagrama para o sistema PEG8000-PVA10000.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes

Para determinação do diagrama de fases foram previamente preparadas soluções reserva dos vários reagentes utilizados (3.3.1), na determinação dos diagramas de fases.

5.2.2 Determinação dos dados de equilíbrio liquido-liquido

Adicionou-se, a uma ampola de decantação, quantidades conhecidas de cada uma das substâncias formadoras das fases (Ucon puro ou solução de reserva de PEG como formadores de uma das fases e quantidades conhecidas de soluções de reserva de sal, PVA10000 ou Reppal PES100 como formadores da outra fase) e água, para perfazer uma massa final de cerca de 10 g (para sistemas Ucon - sal e PEG-PVA) e cerca de 15 g (para sistemas Ucon– Reppal PES100 e Ucon-PVA). Agitou-se a mistura, manualmente, durante, pelo menos, uma hora. Posteriormente, colocou-se o sistema num banho termostatizado (B. Braun da Frigomix S de precisão $\pm$ 0,1 ºC) a 22 ºC por um período de, pelo menos, 24 h, para que se atingisse o equilíbrio. Retiraram-se, então, amostras da fase superior, com o auxílio de uma pipeta, e da fase inferior através de

escoamento pela ampola de decantação, para determinação da composição das 2 fases.

5.2.3 Métodos analíticos

Os métodos usados para determinação dos dados de equilíbrio líquido-líquido dos sistemas foram:

- para o sistema Ucon 50-HB5100-sulfato de amónio ⇨ titulação e índice de refracção
- para os sistemas Ucon 50-HB5100-Reppal PES100, Ucon 50-HB5100-PVA e PEG8000-PVA ⇨ índice de refracção e massa seca.

Uma vez que o índice de refracção de um polímero é aditivo ao índice de refracção de um sal, quando este último se encontra em concentrações baixas (< 10%) (Albertsson, 1986), tornou-se necessário realizar diluições apropriadas das fases (geralmente entre 3 a 5 vezes) e mediu-se o índice de refracção em refractómetro NAR 3T (Atago-Japan). Esta determinação realizou-se a 25 ºC, usando um banho termostatizado (B. Braun, Frigomix S com uma incerteza de $\pm$ 0,1ºC). A partir das soluções de reserva dos polímeros, preparou-se curvas de calibração dos índices de refracção (até 8 % p/p), que posteriormente foram usadas na determinação das composições das fases em equilíbrio.

Por outro lado, a concentração de sulfato de amónio pode ser rigorosamente determinada através da titulação da quantidade de ácido sulfúrico libertado pela reacção entre o sal referido e o formaldeído conforme Equação 5.1.

$$2\ (NH_4)_2SO_4 + 6\ HCHO \Rightarrow N_4(CH_2)_6 + 2\ H_2SO_4 + 6\ H_2O \qquad \text{Equação 5.1}$$

Foi usada uma solução de NaOH 0,1 M para titular o ácido sulfúrico, usando a fenolftaleína como indicador (Yurow e Master, 1978; Lei, 1986).

Assim, subtraindo as concentrações de sal obtidas por titulação em cada uma das fases às respectivas concentrações totais (sal e polímero), determina-se a concentração do polímero em cada fase.

Para a determinação dos restantes diagramas, usou-se uma combinação das medições do índice de refracção e da massa seca conforme descrito na bibliografia (Albertsson, 1986). O índice de refracção foi medido conforme se descreve anteriormente. Para determinação da massa seca, colocou-se amostras diluídas no liofilizador (alpha 2-4, Christ) durante 4-5 dias. Ao fim deste tempo determinou-se a massa e colocou-se, novamente, as amostras no liofilizador mais 2-3 dias para obtenção da massa de PES100 estável (variação da massa inferior a 5 %). Repetiram-se os ensaios para as diversas concentrações de polímero de forma a eliminar aqueles cujo declive da linha de ligação se desviasse muito da média (Zaslavsky 1995). Todas as medições das massas foram realizadas em balança ADA 180 (Adam Equipment Co, Lda) com uma incerteza de ± 0,1 mg.

Confirmou-se a aditividade dos índices de refracção, recorrendo às curvas de calibração, através da medição do índice de refracção a 25 ºC de soluções com 2 polímeros (Ucon-Reppal PES100 ou Ucon-PVA), preparadas a partir das soluções de reserva, com composição conhecida.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$

O dados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22, 30 e 40 ºC, estão presentes na Tabela 5.1, assim como o ponto crítico e os declives da linha de ligação (regressão linear feita para cada linha de ligação), e também os desvios padrão para os ensaios realizados para cada linha de ligação e desvio-padrão obtido para os valores médios de cada linha de ligação.

Tabela 5.1 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por Ucon 50-HB-5100 e $(NH_4)_2SO_4$ a 22, 30 e 40 ºC

Composição total		Fase superior		Fase inferior		Declive	s	Média
Ucon	Sal	Ucon	Sal	Ucon	Sal			
T= 22 ºC								
10,01	6,55	26,52	3,04	2,06	8,45	-4,54	0,133	
16,14	5,80	30,72	2,56	1,34	9,36	-4,32	0,099	-4,24
16,96	6,20	34,72	2,14	0,91	10,20	-4,20	0,104	±0,24
18,91	6,98	39,67	1,68	0,38	11,81	-3,88	0,023	
Ponto crítico: Ucon - 10,80; Sal - 5,32								
T= 30 ºC								
12,03	4,00	6,08	4,94	19,66	2,88	-6,60	0,138	
12,06	4,50	2,89	6,04	27,00	2,22	-6,33	0,164	-6,19
12,05	5,00	1,96	6,72	31,51	1,84	-6,07	0,075	±0,32
12,03	5,52	1,30	7,43	34,96	1,56	-5,74	0,042	
Ponto crítico: Ucon - 11,80; Sal - 3,77								
T= 40 ºC								
10,09	2,57	4,94	3,09	27,72	1,24	-12,50	0,735	
10,00	3,50	1,92	4,30	38,41	0,95	-10,95	0,200	-10,29
9,95	4,47	1,05	5,50	45,73	0,76	-9,48	0,178	±1,60
10,02	5,51	0,60	6,82	51,03	0,63	-8,22	0,210	
Ponto crítico: Ucon – 14,00; Sal – 1,86								

A Figura 5.1 representa os diagramas de fase obtidos e a Figura 5.2 representa as binodais também para cada temperatura.

Da Tabela 5.1 é possível verificar que o desvio padrão obtido para o declive de cada linha de ligação a 22 e a 30 ºC é aproximadamente 0,1. Para o sistema a 40 ºC, é cerca de 0,2 para três linhas de ligação e 0,7 para a quarta linha de ligação. É possível também verificar, que à medida que a temperatura

aumenta, diminuem os valores médios do declive, sendo indicativo do aumento da assimetria dos diagramas.

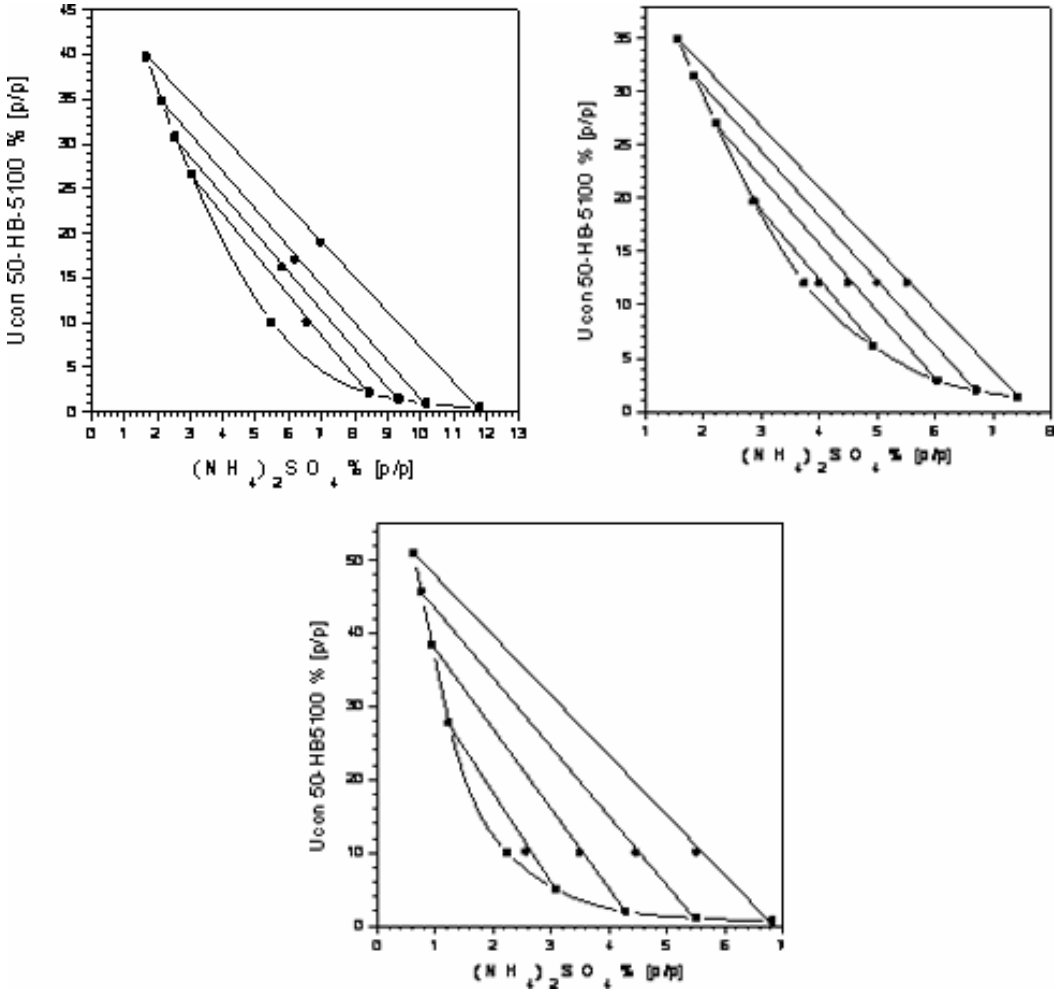


Figura 5.1 Diagrama de fases para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$. (a) 22 ºC, (b) 30 ºC, (c) 40 ºC. Binodal(–■–); Composição total (●).

Na Figura 5.2 é possível verificar que à medida que a temperatura aumenta, menor é a concentração de sal e polímero necessárias para a formação das duas fases (a concentração de sal na fase rica em sal pode decrescer mais rapidamente para cerca de 3 M, no diagrama a 40 ºC).

Li et al. (2000) determinaram o diagrama de fases para o sistema EOPO 4000-$(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC. O polímero EOPO 4000 (copolímero de éter monobutil de

óxido etileno (EO) e óxido propileno (PO)), com razão molar de EO para PO de 1:1 foi produzido pela "Zhejiang University Chemical Factory" com uma média de PES100o molecular (M) de 3500. Na Figura 5.3 estão representados ambos os diagramas.

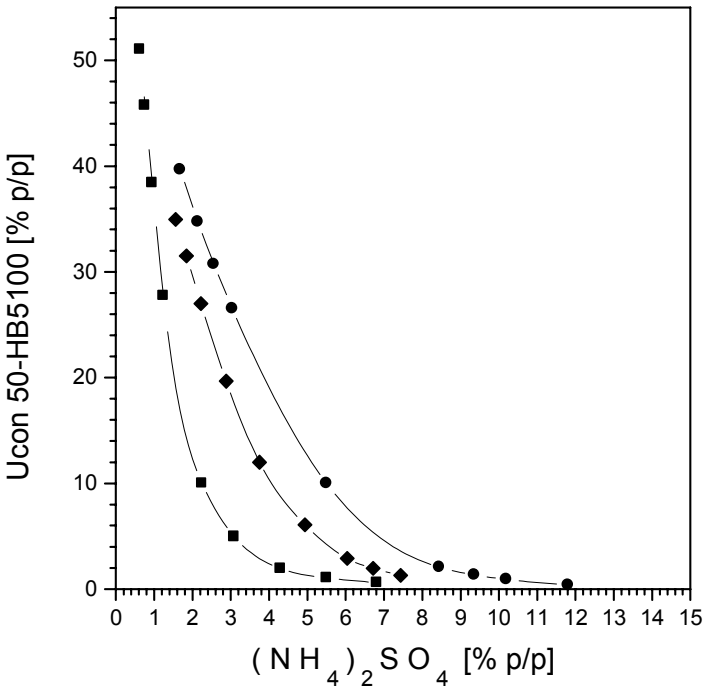


Figura 5.2 Binodais encontradas para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC, 30 ºC e 40 ºC. Binodal a 22 ºC (–●–), binodal a 30 ºC (–♦–) e binodal a 40 ºC (–■–).

Pela análise da Figura 5.3 é possível verificar que a binodal do sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC é muito similar ao sistema EOPO4000-$(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC (Li et al., 2000), indicando que uma pequena diferença no polímero usado e na temperatura tem uma influência negligenciável na binodal. Contudo, as linhas de ligação destes dois sistemas apresentam diferenças na composição das fases superiores.

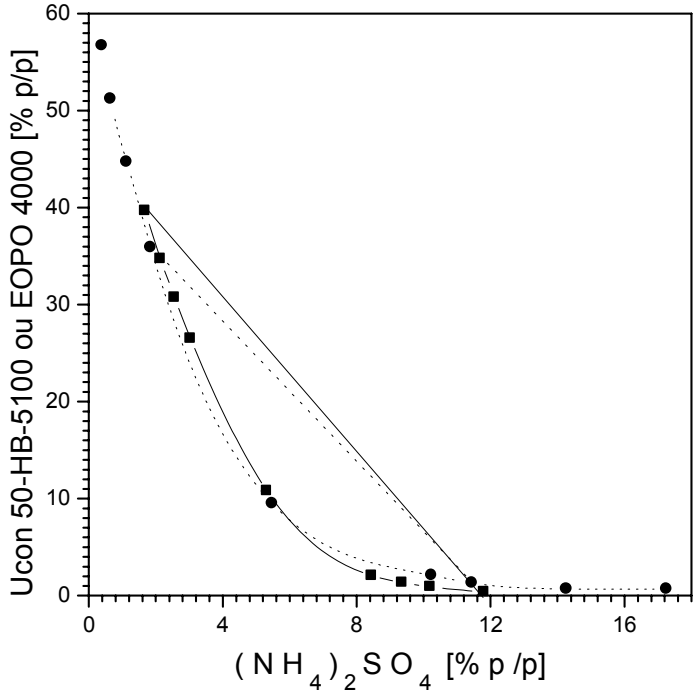


Figura 5.3 Binodal (–■–) e linha de ligação (—) para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC, binodal (…●…) e linha de ligação para o sistema EOPO 4000- $(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC (Li et al., 2000).

Este sistema de duas fases aquosas (Ucon-$(NH_4)_2SO_4$) é semelhante ao sistema polietileno glicol-$(NH_4)_2SO_4$, comummente usado. Contudo, se a massa molecular do polímero e a temperatura se mantiverem, apenas cerca de metade da concentração de sal é necessária para a formação das duas fases deste novo sistema. Por exemplo, a concentração mínima de sal necessária para a formação das duas fases, a 20 ºC, no sistema PEG4000-$(NH_4)_2SO_4$ (Albertsson, 1986) é cerca de 10 % e no novo sistema é apenas 5 %.

Uma vez que o Ucon é um copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno, apresenta características termossensíveis misturado com a água quando a temperatura aumenta para 47 ºC. Esta característica pode também ser usada para efectuar a recuperação deste copolímero, numa fase rica no mesmo.

Este novo diagrama apresenta como características: a necessidade de concentrações baixas de sal, utiliza um copolímero termossensível, e verifica-se a inversão de fases a temperaturas altas de operação (30 ºC e superiores).

5.3.2 Sistema Ucon-PVA e Ucon-Reppal PES100

O diagrama de fases para o sistema Ucon-PVA está representado na Tabela 5.2 e na Figura 5.4. O desvio padrão para o declive de cada linha de ligação é inferior a 0,05.

Tabela 5.2 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por Ucon 50-HB-5100 e PVA10000 a 22 ºC

Composição total		Fase superior		Fase inferior		Declive	s	Média
Ucon	PVA	Ucon	PVA	Ucon	PVA			
T= 22 ºC								
10,47	9,95	12,73	6,50	2,14	19,59	-0,82	0,044	
13,23	10,65	19,31	2,79	1,74	24,51	-0,81	0,014	-0,81
11,04	10,97	16,17	4,13	1,80	21,78	-0,82	0,028	±0,02
13,27	11,80	20,67	2,23	1,68	27,03	-0,77	0,003	
Ponto crítico: Ucon – 6,00; PVA – 13,00								

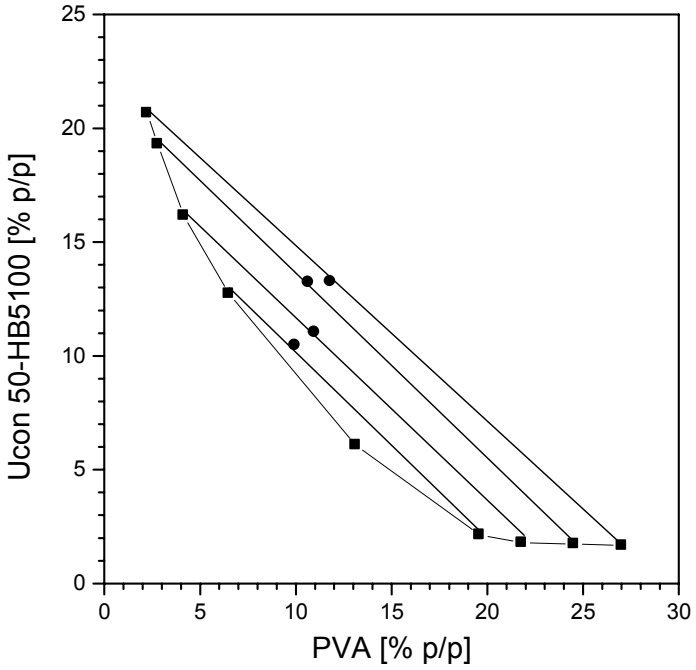


Figura 5.4 Diagrama de fases para o sistema Ucon 50-HB-5100-PVA a 22 ºC. Binodal (–■–); composição total (●).

O diagrama de fases para o sistema Ucon-PES100, presente na Figura 5.5, é muito semelhante ao diagrama obtido por Persson et al. (1998), onde o Ucon é também usado, e também muito semelhante ao diagrama obtido por Persson et al. (1999), onde é usado o Breox 50A1000 (um copolímero de 50 % de óxido de etileno e 50 % de óxido de propileno). Contudo, existem pequenas diferenças na composição da fase inferior. Os dados obtidos por Persson et al. (1998; 1999) apresentam, na fase inferior, quantidade menores do copolímero EOPO. Este facto pode ser explicado pela diferença de temperaturas usada (20 ºC). Verifica-se que o desvio padrão associado à média dos declives é 0,02.

Ambos os sistemas, Ucon-PVA e Ucon-Reppal PES100 são muito semelhantes ao sistema PEG-Reppal PES100 (Zaslavsky, 1995), onde são necessárias grandes concentrações de polímero para ocorrer a formação das fases.

Tabela 5.3 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por Ucon 50-HB-5100 e Reppal PES100 a 22 ºC

Composição total		Fase superior		Fase inferior		Declive	s	Média
Ucon	PES100	Ucon	PES100	Ucon	PES100			
T= 22 ºC								
4,73	12,08	5,99	8,84	2,36	16,73	-0,46	0,033	
8,04	12,94	12,36	3,50	1,75	26,03	-0,47	0,006	-0,46
6,27	13,41	9,46	5,87	1,93	23,03	-0,44	0,079	±0,01
7,09	13,92	11,42	4,27	1,80	25,07	-0,46	0,007	
4,50	15,02	8,22	6,76	2,07	19,92	-0,47	0,012	
Ponto crítico: Ucon – 3,69; PES100 – 12,30								

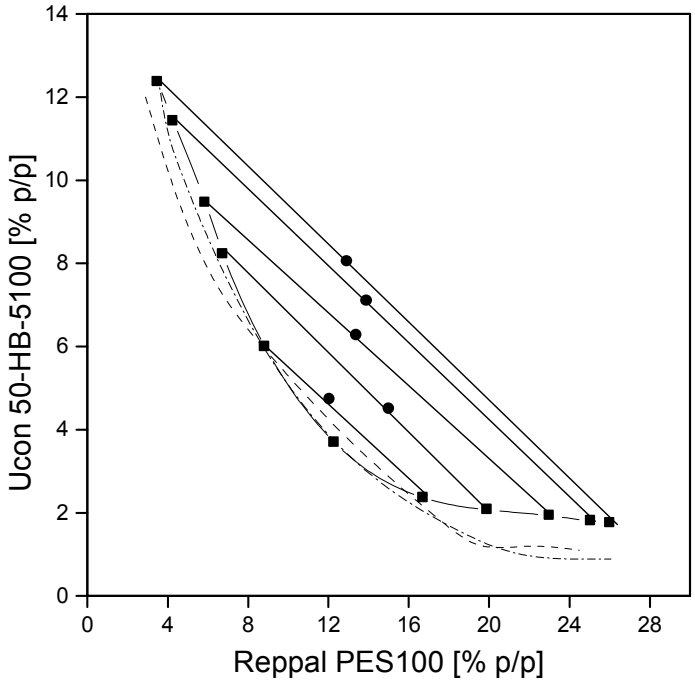


Figura 5.5 Diagrama de fases para o sistema Ucon 50-HB-5100-Reppal PES100 a 22ºC. Binodal (—■—); composição total (●). Binodal para o sistema Ucon 50-HB-5100-Reppal PES100 a 20 ºC (Persson et al., 1998) (…….); binodal para o sistema Breox PUR A1000-Reppal PES100 a 20 ºC (Persson et al., 1999) (— . —).

5.3.3 Sistema PEG8000 – PVA10000

Os dados obtidos para o sistema PEG8000 – PVA10000 estão presentes na Tabela 5.4 e na Figura 5.6. Na mesma figura é apresentada a curva da binodal para o sistema PEG20000 –PVA10000 (Fisher and Sutherland, 1989) para comparação entre os dois sistemas. Uma vez que o polímero PEG8000 tem uma massa molecular inferior ao polímero PEG20000, a formação das duas fases ocorre a concentrações mais elevadas de polímero no sistema PEG8000 – PVA10000. Da Tabela 5.4 é possível verificar que o desvio padrão para a média dos declives das linhas de ligação é de 0,02.

Tabela 5.4 Composição das fases, ponto crítico, declives das linhas de ligação, desvio padrão (s) e média dos declives das linhas de ligação para o sistema de duas fases aquosas composto por PEG8000 e PVA10000 a 22 ºC

Composição total		Fase superior		Fase inferior		Declive	s	Média
PEG	PVA	PEG	PVA	PEG	PVA			
T= 22 ºC								
4,3	9,3	6,2	6,0	2,9	11,7	-0.58	0,0021	
4,8	9,9	8,1	3,8	2,0	15,0	-0.54	0,0023	-0,55
5,3	10,5	9,3	3,0	1,5	17,5	-0.54	0,0027	±0,02
6,0	11,9	11,1	2,4	1,3	20,8	0,53	0,0025	
Ponto crítico: PEG – 8,00; PVA – 4,10								

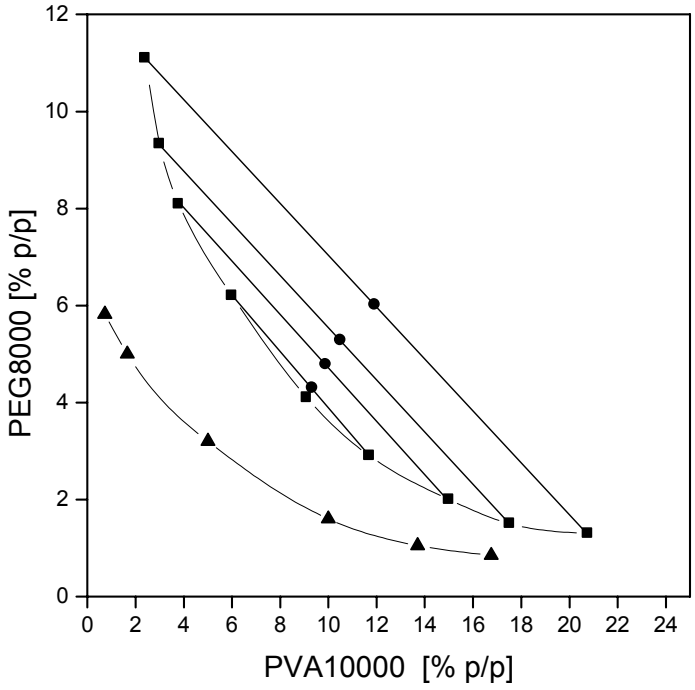


Figura 5.6 Diagrama de fases do SDFA PEG8000 - PVA10000 a 22 ºC. Binodal (—■—); composição total (●) para o sistema com PEG8000; binodal (▲—▲) para o sistema com PEG20000, como apresentado em Fisher and Sutherland (1989).

5.4 CONCLUSÕES

Foram determinados os diagramas de equilíbrio líquido-líquido para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, Ucon–PVA10000, Ucon– Reppal PES100 e PEG8000-PVA10000. É possível verificar que o polímero termossensível é uma boa alternativa para ser usado nos sistemas de duas fases aquosas. Para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ verifica-se que a formação de fases é dependente da temperatura, uma vez que ocorre inversão de fases aumentando a temperatura, e que necessita de menos quantidade de sal e de polímero para a formação das fases. Estas características fazem deste sistema um sistema versátil e atractivo para ser usado em biosseparações. Verificou-se também que o sistema considerado é muito semelhante ao determinado por Li et al. (2000) em que foi usado um polímero semelhante ao Ucon e também ao SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$. Em relação a este último SDFA, o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ também se apresenta mais

vantajoso uma vez que, para as mesmas condições, a concentração de sal necessária para a formação do sistema é cerca de metade.

O sistema Ucon-Reppal PES100 obtido vai de encontro aos determinados por Persson et al. (1998; 1999) em que foram usados polímeros termossensíveis semelhantes ao Ucon.

Os sistemas em que é utilizado PVA têm a desvantagem de o polímero não poder ser recuperado quando se usa em escala industrial, contudo alargam as possibilidades para utilização de SDFA na separação de biomoléculas.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertsson, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules, 3rd ed; John Wiley and Sons: New York, 1986.

Alred, P. A., Tjerneld, F., Koslawsky, A. e Harris, M. J. Synthesis of dye conjugates of ethylene oxide-propylene oxide copolymers and application in temperature-induced phase partitioning. *Bioseparation*. 2, 363-373. 1992.

Fisher, D. e Sutherland, I. A. Separations using aqueous phase systems: applications in cell biology and biotechnology; Plenum: New York, 1989.

Johansson, H.-O., Karlström, G., Mattiasson, B. e Tjerneld, F. Effects of hydrophobocity and counter ions on the partitioning of aminoacids in thermoseparating ucon-water two phase systems. *Bioseparation*. 5, 269-279. 1995.

Johansson, H.-O., Karlström, G., Tjerneld, F. e Haynes, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*. 711, 3-17. 1998.

Johansson, H.-O., Persson, J. e Tjerneld, F. Thermoseparated water/polymer system: a novel one-polymer aqueous two-phase system. B*iotechnology and Bioengineering*. 66, 247-257. 1999.

Kula, M.-R., Kroner, K. H. e Hustedt, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*. 24, 73-118. 1982.

Yurow, H. W. e Master, I. Novel colour reactions for ammonium ion in acidic solution. *Talanta*. 25 (7), 423-424. 1978.

Lei, Y., Zheng, Q. e Xu, M. Determination of nitrogen in ammonium by potentiometry. *Chongqing Daxue Xuebao*. 9 (4), 134-40. 1986.

Li, W., Lin, D.-Q. e Zhu, Z.-Q. Measurement of water activities and prediction of liquid-liquid equulibria for water + ethylene oxide-propilene oxide random copolymer + ammonium sulfate systems. Fluid Phase Equilibr. 93, 15-26. 2000.

Persson, J., Nyström, L., Ageland, H. e Tjerneld, F. Purification of recombinant apolipoprotein A-1_{Milano} expressed in Escherichia coli using aqueous two-phase extraction followed by temperature induced phase separation. *Journal of Chromatography B*. 711, 97-109. 1998.

L Persson, J., Nyström, L., Ageland, H. e Tjerneld, F. Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature-induced phase separation. *Biotechnology and Bioengineering*. 65, 371-381. 1999.

Sturesson, S., Tjerneld, F. e Johansson, G. Partitioning of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 26, 281-295. 1990.

Veide, A., Leindbäck, T. e Enfors, S.-O. Continuous extraction of β-D-galactosidase from Escherichia coli in an aqueous two-phase system: effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer. *Enzyme and Microbial Technology*. 6, 325-330. 1984.

Venâncio, A., Teixeira J. A. e Mota, M. Evaluation of crude hydroxypropyl starch as a bioseparation aqueous-phase forming polymer. *Biotechnology Progress*. 9, 635-639. 1993.

Zaslavsky, B. Y. Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications; Marcel Dekker: New York. 1995.



Capítulo 6

Separação da enzima com SDFA

123	6	Separação da enzima com SDFA
125	6.1	Introdução
126	6.2	Materiais e Métodos
126	6.2.1	Produção da enzima endo-poligalacturonase
126	6.2.2	Reagentes
126	6.2.3	Preparação da amostra para os ensaios de partição
127	6.2.4	Ligandos
127	6.2.5	Preparação dos Sistemas para os Ensaios de Partição
127	6.2.6	Preparação dos Sistemas para os Ensaios de Extracção
128	6.2.7	Métodos Analíticos
128	6.2.8	SDS-Page
131	6.2.9	Coloração por nitrato de prata
133	6.3	Resultados
133	6.3.1	Partição da endo-PG nos SDFA sem ligandos
138	6.3.2	Partição da endo-PG nos SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com ligandos
140	6.3.3	Extracção da endo-PG à escala laboratorial
144	6.3.4	Partição da enzima nos sistemas PEG-PVA
147	6.3.5	Esquema de separação para extracção da enzima
151	6.4	Conclusões
153	6.5	Referências bibliográficas

A partição da enzima endo-poligalacturonase e da proteína total do sobrenadante da fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* é estudada, utilizando para tal os seguintes SDFA: PEG-$(NH_4)_2SO_4$, PEG-fosfato de potássio (pH=7), PEG-PVA10000 e PEG-Reppal PES100. Para os dois primeiros sistemas, a enzima e a proteína total migram para a fase inferior do SDFA, enquanto no caso do sistema PEG-PVA10000 a enzima predomina na fase superior e a proteína na fase inferior. São propostos dois esquemas de separação para a enzima. No primeiro esquema são utilizados dois SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ consecutivos, em que no primeiro se faz a separação da enzima e no segundo se faz a recuperação do polímero. A enzima é recolhida na fase inferior do primeiro sistema e sofre posteriormente uma diálise, de modo a remover os sais. Obteve-se um factor de purificação de 1,7.

No segundo esquema de separação é feita uma primeira extracção usando o sistema PEG-PVA10000, cujo principal objectivo é proceder à purificação da enzima, e uma segunda extracção num sistema PEG-$(NH_4)_2SO_4$, que permite concentrar a enzima endo-PG. Este esquema de separação permite a separação da enzima da fase rica em polímero e também a reciclagem do PEG. São realizados ensaios laboratoriais para avaliar a eficiência deste esquema de separação, que permitem observar que cerca de 91% da enzima é recuperada com um factor de purificação de 1,9 e um factor de concentração superior a 5.

6.1 INTRODUÇÃO

Na literatura estão descritos vários métodos para separar as pectinases do sobrenadante da fermentação. Harsa et al. (1993) fez uma revisão dos métodos existentes. A maioria dos processos envolve várias etapas de separação desde a precipitação, filtração por membranas e filtração em gel, troca iónica, cromatografia por afinidade e diálise e são mais usados em caracterização da enzima (Schwan et al., 1997; Harsa, 1991) do que usados à escala industrial. Estes processos não apresentam características tais como facilidade no aumento da escala, baixos custos de operação que permitam a sua utilização a nível industrial. Como consequência Harsa et al. (1993) apresenta a separação das pectinases para fins comerciais utilizando a troca iónica. Este método apresenta-se vantajoso uma vez que é simples para implementar e permite obter uma recuperação de enzima muito alta (superior a 93%). Contudo, este método tem como desvantagem o elevado tempo para se realizar a operação e também a quantidade elevada de fluido recolhido.

A extracção bifásica aquosa apresenta-se como uma técnica útil, de fácil aumento de escala, para se proceder à separação de enzimas (Almeida et al., 1998; Venâncio et al., 1996; Lin et al., 1996; Johansson and Tjerneld, 1989), células (Sturesson et al., 1990), ácido nucleico (Persson et al., 1999) e outras biomoléculas (Albertsson, 1986; Fisher e Sutherland, 1989).

Como foi referido no capítulo 4, a enzima endo-PG é bastante usada comercialmente quando não se encontra misturada com outro tipo de enzimas. As principais aplicações são na indústria de processamento de frutas quando se pretende manter o carácter encorpado dos mesmos, na indústria de comida para bebé, na fermentação do cacau, etc.

Deste modo, torna-se necessário desenvolver um processo de separação da enzima endo-PG que seja facilmente adaptável à produção industrial de enzima.

Pretende-se com o trabalho presente neste capítulo, estudar a partição da enzima endo-PG, produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* em vários sistemas de duas fases aquosas: PEG-$(NH_4)_2SO_4$, PEG-fosfato de potássio, PEG-Reppal PES100 e PEG-PVA de modo a encontrar um esquema de separação alternativo à troca iónica para a separação da enzima.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Produção da enzima endo-poligalacturonase

A enzima endo-poligalacturonase foi obtida por fermentação, a 30 ºC, da estirpe *Kluyveromyces marxianus* CCT3172. A fermentação foi realizada em frascos rolhados, a 30 ºC, com a seguinte composição do meio: 10,0 $g.L^{-1}$ glucose, 3,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 4,5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0,25 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$, 0,25 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$ e 1,0 $g.L^{-1}$ de extracto de levedura, adaptado de Patching e Rose (1969).

6.2.2 Reagentes

Os sistemas de duas fases aquosas utilizados neste capítulo foram construídos com reagentes provenientes de várias origens, conforme secção 3.3.1. Foram preparadas soluções de reserva dos vários reagentes utilizados. Assim, para PEG de pesos moleculares 4000, 8000 e 20000 foram preparadas soluções de 40 % ou 50 %. Para os sais, $(NH_4)_2SO_4$ e fosfato de potássio (306,9 g K_2HPO_4 e 168,6 g KH_2PO_4, pH=7) foram preparadas soluções de 40 %, para PVA10000 foi preparada uma solução de reserva de 30 % e para Reppal PES100 uma solução de 40 %, conforme secção 3.3.1.

6.2.3 Preparação da amostra para os ensaios de partição

Nos ensaios de partição foram preparadas três tipos de soluções. Na preparação da solução A utilizou-se o seguinte procedimento:

- obteve-se o sobrenadante da fermentação, por centrifugação da amostra recolhida após a fermentação da levedura *K. marxianus*;

- liofilizou-se o sobrenadante no liofilizador (alpha 2-4, Christ);
- dissolveu-se o liofilizado em água destilada, de modo a obter uma solução cerca de 8 vezes mais concentrada em enzima, que o sobrenadante original.

A solução B foi obtida a partir da solução A, por diálise desta última em membrana de porosidade 14000 Da, contra água destilada a 5 ºC.

A solução C consiste apenas no sobrenadante da fermentação.

6.2.4 Ligandos

Os ligandos foram preparados de acordo o descrito na secção 3.3.2.

6.2.5 Preparação dos sistemas para os ensaios de partição

Adicionou-se 0,2 mL de solução previamente preparada (6.2.3) e quantidades adequadas de PEG e sal ou PEG e PVA ou PEG e Reppal PES100 de forma a construir um sistema com 1 g. Nos ensaios de afinidade adicionou-se também quantidades adequadas de ligando.

Agitou-se fortemente esta mistura e centrifugou-se a 3000 rpm durante 3 minutos. De seguida, colocou-se numa estufa a 25 ºC ou 20 ºC durante 12 horas. Foram recolhidas amostras da fase inferior e superior com ajuda de micropipetas.

6.2.6 Preparação dos sistemas para os ensaios de extracção

Para os ensaios de extracção, os sistemas prepararam-se a partir de soluções de reserva de PVA 30 %, PEG 50 % e a partir de PEG sólido. Por vezes também foi utilizada solução de PEG recuperado (cerca de 52 %).

Adicionou-se então quantidades de PEG e de sal e dependendo da origem do PEG (solução reserva, sólido ou recuperado) adicionou-se sobrenadante da fermentação em cerca de 56-64 % do peso do sistema total.

6.2.7 Métodos Analíticos

A concentração de proteína em cada uma das fases foi quantificada como descrito em 3.2.3. As fases foram previamente diluídas para que a concentração de PEG ou sal fosse inferior a 2 %.

A enzima foi quantificada medindo a libertação de açúcares redutores do ácido poligalacturónico usando o DNS (Schwan and Rose, 1994) nos resultados apresentados nas secções 6.3.1, 6.3.2 e 6.3.3, e usando a cianoacetamida nos resultados apresentados nas secções 6.3.4 e 6.3.5, conforme descrito em 3.2.1. Alguns ensaios mostraram que concentrações altas de sal e PEG podem interferir com a determinação, motivo pelo qual as amostras das fases foram diluídas da seguinte forma:

- para a fase rica em PEG a diluição foi feita de modo que a concentração do polímero fosse inferior a 2 %;
- para a fase rica em sal a diluição foi feita de modo que a concentração de sal fosse inferior a 0,025 M.

A concentração de ligando foi determinada medindo a densidade óptica (DO) de cada uma das fases, ao comprimento de onda óptimo para cada ligando, num espectrómetro UV/Vis (modelo 7850, Jasco, Inc., EUA) e correlacionando estes valores com a concentração de ligando. O branco usado para estas determinações foi de água destilada. As calibrações foram efectuadas para cada um dos ligandos, no seu comprimento de onda máximo (ver secção 3.3.2).

6.2.8 SDS-PAGE

O aparelho de electroforese foi, cuidadosamente, limpo com isopropanol.

De seguida, e imediatamente após a sua preparação, aplicou-se a solução do gel de separação. Com uma pipeta Pasteur, fez-se descer a solução ao longo de um dos espaçadores até que ficasse um espaço vazio de cerca de 1 cm até ao topo do vidro da câmara de electroforese. Para a preparação de gel de electroforese 12,5 % (p/V), prepararam-se as soluções do gel de separação com

as constituições descritas na Tabela 6.1, sendo os reagentes adicionados exactamente na ordem descrita.

Tabela 6.1 Composição e metodologia de preparação do gel de separação e do tampão TRIS/HCl/SDS para a realização da electroforese

Solução	Composição	Preparação
Gel de separação 12,5 %(p/V)	Acrilamida Bis-acrilamida APS TEMED	Juntar: 6,25 mL da solução 30 %(p/V) Acrilamida/0,8 % (p/V) Bis-acrilamida; 4,375 mL da solução 1,5 M Tris/HCl/SDS pH 8,8 4,375 mL água destilada 50 µl 10 % (p/V) APS 10 µl TEMED
1,5 M Tris/HCl/SDS pH 8,8	Tris HCl SDS	Dissolver 91 g Base Tris em 300 mL água destilada Acertar o pH 8,8 com 1 N HCl Adicionar 10 mL 20 % (p/V) SDS Adicionar água destilada até perfazer volume final de 500 mL

Deixou-se polimerizar o gel de separação com a parte superior coberta com uma camada de isopropanol, cuidadosamente aí colocada com outra pipeta de Pasteur. Em seguida retirou-se o isopropanol lavando com solução 1,5 M Tris/HCl/SDS pH 8,8 quatro vezes diluída. Preparou-se o gel de empacotamento a aplicar no topo do gel de separação, e com uma pipeta de Pasteur, aplicou-se cuidadosamente de forma a não formar bolhas de ar. O pente de Teflon com 0,75 mm de espessura foi colocado e aguardou-se a polimerização do gel de empacotamento (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 Composição e preparação do gel de empacotamento e do tampão necessário para a sua preparação

Solução	Composição	Preparação
Gel de empacotamento	Acrilamida Bis-acrilamida Tris HCl SDS APS TEMED	Juntar: 1,25 mL da solução 30 % (p/V) Acrilamida/0,8 % (p/V) Bis-acrilamida; 1,25 mL da solução 0,5 M Tris/HCl/SDS pH 6,8 3,05 mL água destilada 25 µl 10 % (p/V) APS 5 µl TEMED
0,5M Tris/HCl/SDS pH 6,8	Tris HCl SDS	Dissolver 6,05 g Base Tris em 40 mL água destilada Acertar o pH 6,8 com 1 N HCl Adicionar 2 mL 20 % (p/V) SDS Adicionar água destilada até perfazer volume final de 100 mL

Inseriu-se a câmara de electroforese contendo o gel, na tina vertical de electroforese para onde foi previamente vertido o electrólito SDS-PAGE, de forma a cobrir a câmara por completo. De seguida, retirou-se cuidadosamente o pente sem se romper as extremidades do gel de poliacrilamida e lavaram-se os poços com o electrólito SDS-PAGE (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 Composição e preparação do electrólito SDS-PAGE

Solução	Composição	Preparação
Electrólito SDS-PAGE	Tris Glicina SDS	Juntar: 6,04 g Base Tris; 28,8 g Glicina 10 mL da solução 20 % (p/V) SDS Adicionar água destilada até perfazer volume 2 L.

Todas as amostras a aplicar no gel foram tratadas da mesma forma. A 10 µL de amostra adicionou-se 10 µL de solução tampão A (Tabela 6.4), mistura esta que é fervida durante 3-5 minutos a 100 ºC. Este procedimento permite inibir eventuais proteases existentes na amostra a analisar.

Tabela 6.4 Composição e preparação do tampão A

Solução	Composição	Preparação
Tampão A	Tris/HCl/SDS SDS 2-Mercaptoetanol Glicerol Bromofenol Azul de bromofenol	Juntar: 25 mL de solução 0,5 M Tris/HCl/SDS pH 6,8; 4 mL 20 % (p/V) 2-mercaptoetanol; 20 mL glicerol; 5 mg azul de bromofenol Adicionar água destilada até perfazer volume 100 mL.

As amostras são aplicadas no gel que é depois submetido a uma corrente de 4 mA até as amostras entrarem no gel de separação, após o que se aumentou a intensidade para 8 mA. A electroforese termina quando as marcas azuis atingem a parte inferior do gel.

6.2.9 Coloração por nitrato de prata

O método da coloração por nitrato de prata baseia-se na capacidade que as proteínas possuem para se ligarem aos iões prata. Supõe-se que a complexação dos iões prata com os grupos amina ocorre num ambiente alcalino e com o enxofre dos resíduos de cisteína e metionina (Patel et al., 1988). Para a coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata, aplicou-se o método de Blum et al. (1987). Imergiu-se o gel em solução de fixação A e colocou-se sobre um agitador orbital durante 20 minutos com baixa agitação. Retirou-se a solução de fixação e lavou-se o gel três vezes, 10 minutos cada, com solução de lavagem. Retirada a solução de lavagem imergiu-se o gel em solução de pré-

tratamento durante 1 minuto após o qual se lavou o gel com água destilada, 3 vezes, 20 segundos cada. Adicionou-se a solução de coloração permitindo o contacto com o gel durante 10 minutos, lavando-se em seguida 2 vezes com água destilada durante 20 segundos. Depois, imergiu-se em solução de revelação durante o período de tempo necessário para o aparecimento das bandas ou seja, de 2 a 5 minutos. Por fim, procedeu-se a nova lavagem com água destilada, 2 vezes de 2 minutos cada, e imergiu-se o gel em solução de paragem durante 5 minutos. Procedeu-se então à secagem do gel.

Tabela 6.5 Composição e preparação das soluções de fixação, lavagem, pré-tratamento, coloração, revelação e lavagem usadas na coloração por nitrato de prata

Solução	Composição	Preparação
Solução fixação A	Metanol	50 % (V/V) metanol
	Ácido Acético	12 % (V/V) ácido acético
	Formaldeído	0,05 % (V/V) formaldeído a 37 % (V/V)
Solução lavagem	Etanol	50 % (V/V) etanol
Solução pré-tratamento	$Na_2S_2O_3.5H_2O$	0,02 % (p/V) $Na_2S_2O_3.5H_2O$
Solução coloração	$AgNO_3$	0,2 % (p/V) $AgNO_3$
	Formaldeído	0,075 % (V/V) formaldeído a 37 % (V/V)
Solução revelação	Na_2CO_3	6 % (p/V) Na_2CO_3
		0,05 % (V/V) formaldeído a 37 % (V/V);
		4 mg/L $Na_2S_2O_3.5H_2O$
Solução paragem	Metanol	50 % (V/V) metanol
	Ácido acético	12 % (V/V) ácido acético

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Partição da endo-PG nos SDFA sem ligandos

Foram usados dois tipos de SDFA PEG-sal: PEG-$(NH_4)_2SO_4$ (PEG4000, 8000 e 20000) e PEG-fosfato de potássio (pH=7) (PEG4000, 8000 e 20000). A Figura 6.1 mostra a partição da endo-poligalacturonase nos sistemas PEG-$(NH_4)_2SO_4$, enquanto a Figura 6.2 mostra os resultados para o sistema PEG-fosfato (pH=7).

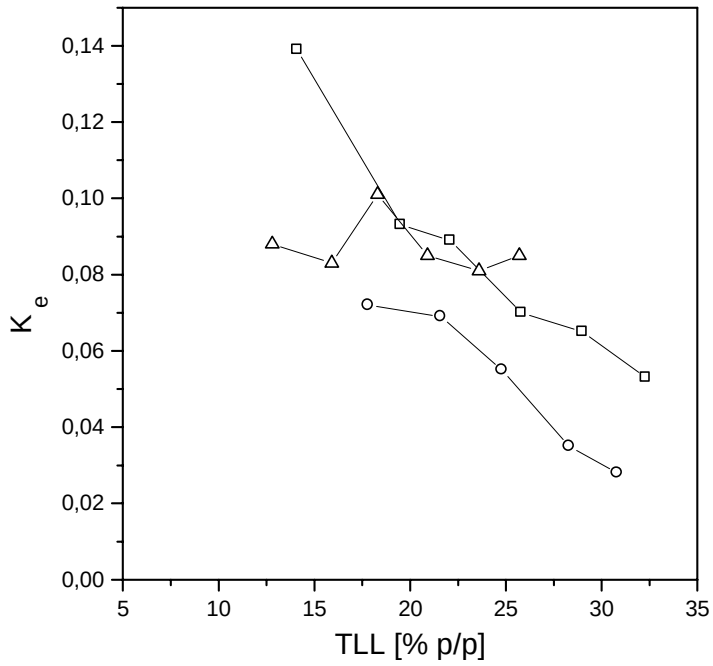


Figura 6.1 Partição da endo-poligalacturonase no SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ a 25 ºC. A razão de volume de fases é de 1:1. PEG4000-$(NH_4)_2SO_4$ (—□—), PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ (—○—), PEG20000-$(NH_4)_2SO_4$ (—Δ—).

Em ambos os sistemas verifica-se uma forte tendência para a enzima se concentrar na fase inferior rica em sal. Isto implica que a endo-PG é extremamente hidrófilica uma vez que a fase superior, rica em PEG, é hidrofóbica.

Verifica-se também que aumentando o comprimento da linha de ligação (TLL) do SDFA o K_e, geralmente decresce e desde que a concentração de PEG aumenta com o aumento do TLL na mesma razão de volumes de fases, o K_e decresce com o aumento da concentração de PEG.

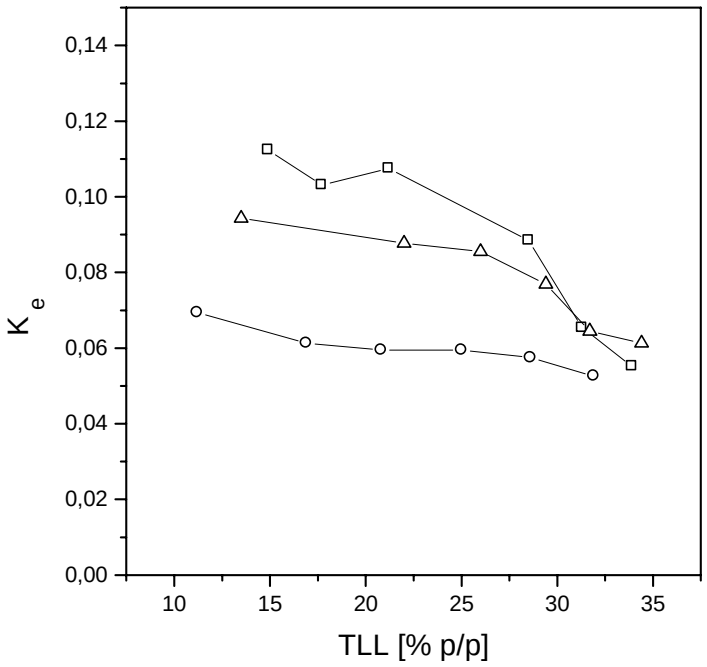


Figura 6.2 Partição da endo-poligalacturonase no SDFA PEG-fosfato a 25 ºC. A razão de volume de fases é de 1:1. PEG4000-fosfato (—□—), PEG8000-fosfato (—○—), PEG20000-fosfato (—Δ—).

Na relação entre o coeficiente de partição da enzima, K_e, e o peso molecular do PEG, verifica-se que o K_e decresce quando a massa molecular varia de 4000 para 8000. Contudo, o coeficiente de partição da enzima no SFDA PEG20000-$(NH_4)_2SO_4$ encontra-se localizado entre os valores dos sistemas constituídos pelos polímeros PEG4000 e PEG8000, excepto no ponto em que TLL é o valor mais alto testado.

Foram realizados ensaios para a partição da enzima fazendo variar outras condições como o pH e a razão de volume de fases (PR – sigla inglesa de "phase

ratio"), em ambos os SDFA. A Figura 6.3 mostra a variação do coeficiente de partição da enzima, no sistema PEG-$(NH_4)_2SO_4$, em função do pH. A Figura 6.4 ilustra a variação da partição da enzima, em ambos os sistemas, em função da razão do volume de fases.

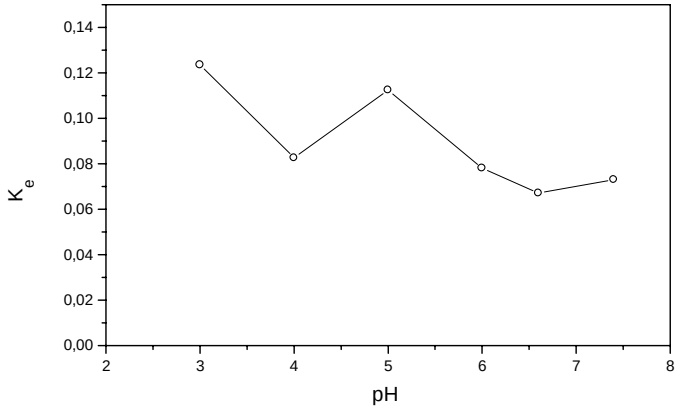


Figura 6.3 Partição da enzima endo-PG no SDFA PEG8000 9,6 %-$(NH_4)_2SO_4$ 9,5 % a diferentes pH, a 25 ºC. O tampão utilizado foi 0,04 M de ácido cítrico-Na_2HPO_4.

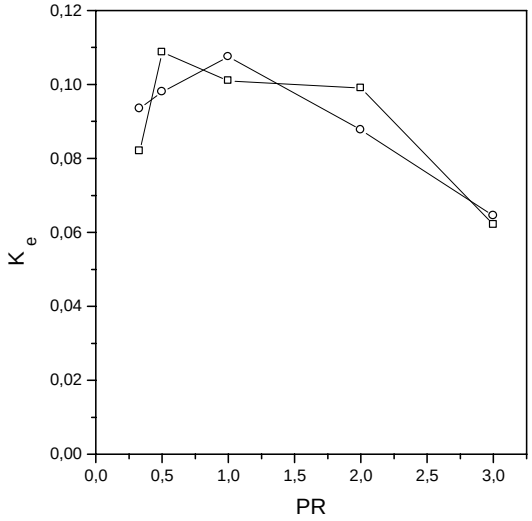


Figura 6.4 Partição da enzima endo-PG em dois SDFA PEG-sal em função da razão do volume de fases, a 25 ºC. O TLL do SFDA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ é cerca de 15,8 %, e cerca de 17,7 % no SDFA PEG 4000-fosfato (pH=7). PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ (—□—), PEG4000-fosfato (—○—).

Analisando a Figura 6.3 verifica-se que a enzima continua dominante na fase inferior rica em sal, independentemente do pH considerado e o valor de K_e varia somente ligeiramente quando o pH aumenta de 3 para 7,4. Este facto indica que a variação da carga na superfície da enzima (o ponto isoeléctrico da endo-poligalacturonase varia de 5,5 até 6,3 (Barnby et al., 1990) não é suficiente para alterar o carácter hidrofílico da endo-PG.

Analisando a Figura 6.4, verifica-se que para o sistema PEG8000-fosfato o valor de K_e mantém-se sensivelmente constante até PR=1, diminuindo significativamente a partir daí e à medida que PR aumenta. No caso do sistema PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ o valor de K_e tem tendência para aumentar ligeiramente quando 0,25<PR<0,5, mantendo-se sensivelmente constante quando PR varia de 0,5 até 2, diminuindo significativamente, a partir daí e à medida que PR aumenta. Esta evidência indica que a separação eficiente da endo-PG pode ser facilmente realizada a razão de volume de fases alta.

Assim, o parâmetro mais importante para a extracção da enzima endo-PG é a razão do volume das fases, que influencia e recuperação da enzima, bem como, a concentração da enzima da fase inferior. A Figura 6.5 mostra a actividade específica e a recuperação da endo-PG na fase inferior para várias razões de volume de fases.

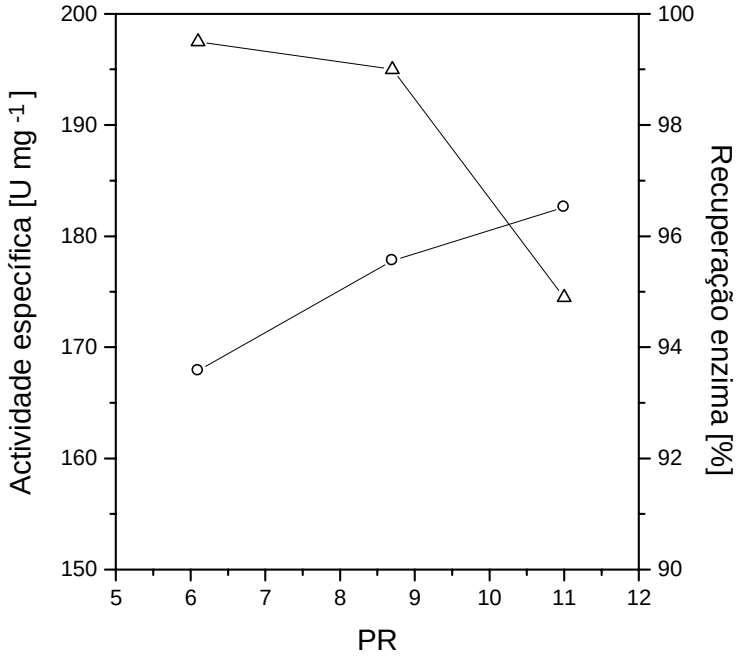


Figura 6.5 Actividade específica e recuperação da endo-PG na fase inferior em função da razão do volume de fases. O sistema usado foi PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação de 28 %. Actividade específica (—○—), recuperação da enzima (—△—).

Como pode ser verificado, quanto maior a razão do volume de fases, maior a actividade específica e menor a recuperação da enzima.

A partição da proteína total é também importante e assim a Figura 6.6 mostra a partição da proteína total para a solução de enzima A (K_p) e B (K_p') nos sistemas PEG-$(NH_4)_2SO_4$ e PEG-fosfato. É possível ver que em ambos os SDFA a proteína total na solução A é obtida na fase inferior rica em sal e o valor de K_p permanece sensivelmente constante à medida que o TLL do SDFA aumenta. Na solução B, que sofreu uma diálise e consequentemente as proteínas de peso molecular inferior a 14000 Da e outras pequenas moléculas (substratos não consumidos e subprodutos da fermentação) foram removidas, a proteína total concentra-se mais facilmente na fase inferior para o sistema PEG-$(NH_4)_2SO_4$, contudo para os sistema PEG-fosfato o valor de K_p' permanece sensivelmente constante.

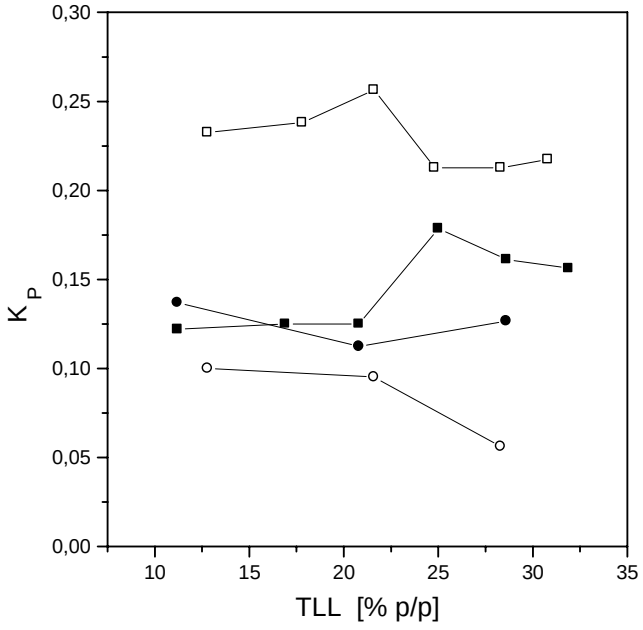


Figura 6.6 Partição da proteína total nos SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ e PEG8000-fosfato (pH=7), a 25ºC. A razão do volume de fases é cerca de 1:1. PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com solução A (—□—), PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com solução B (—○—), PEG-fosfato com solução A (—■—), PEG-fosfato com solução B (—●—).

6.3.2 Partição da endo-PG nos SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com ligandos

Para tentar ultrapassar esta situação (enzima e proteína separadas na mesma fases) e uma vez que os ligandos têm sido usados para estabelecer interacções com as proteínas (Venâncio, 1996), os ligandos foram introduzidos nos sistemas PEG-sal.

Para estudar a partição da enzima e proteína total foram construídos sistemas PEG-$(NH_4)_2SO_4$ utilizando a solução A e com a introdução de ligandos. Os resultados são apresentados na Tabela 6.6 e Figura 6.7. Como pode ser observado (Tabela 6.6), para todos os 7 ligandos usados, o ligando é concentrado na fase superior, mas a enzima endo-PG continua a ser encontrada na fase inferior (Figura 6.7). A influência da concentração dos ligandos na

partição da enzima é muito pequena, uma vez que para variações de concentrações da ordem 0 até 1,2 $mg.g^{-1}$ o valor de K_e varia de 0,04 até 0,06.

Tabela 6.6 Partição da proteína total e dos ligandos no SDFA 13% PEG8000-9,9% $(NH_4)_2SO_4$, com uma concentração de ligandos de 0,2 mg.g-1

Ligando	$\lambda_{máx}$ /nm	K_L	K_p	K_p'
Sem ligando	n.d.	n.d.	0,21	0,06
Procion Navy H-ER 150	610	0,0018	0,48	0,15
Procion Yellow MX-3R	415	0,0021	0,09	0,08
Procion Yellow H-E4R	415	0,0014	0,30	0,34
Procion Navy MX-4RD	610	0,0016	0,45	0,23
Levafix Royal Blue E-FR	615	0,0026	0,33	0,15
Levafix Navy Blue E-BNA	605	0,0012	0,34	0,26
Levafix Red E-3RN	500	0,0013	0,28	0,28

A partição da proteína total na presença de ligandos numa concentração de 0,2 $mg.g^{-1}$ (Tabela 6.6) mostra que K_p e K_p' são inferiores a 0,5 e tornam-se ligeiramente superiores (excepto para K_p na presença do ligando Procion Yellow MX-3R) quando comparados com os ensaios em que não se utilizou ligandos. A maioria dos valores de Kp' é inferior aos de K_p.

Os resultados obtidos evidenciam que o factor de purificação não aumentou significativamente devido à utilização dos ligandos.

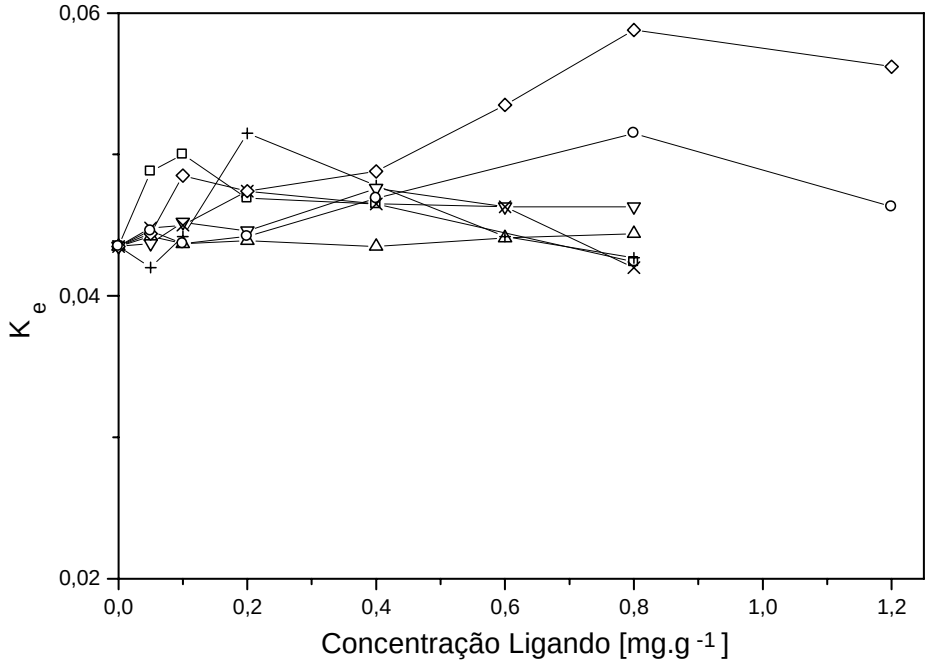


Figura 6.7 Partição da endo-poligalacturonase no SDFA PEG8000 13 % -$(NH_4)_2SO_4$ 9,9 % utilizando ligandos, a 25ºC. H-ER (—□—), H-E4R (—Δ—), MX-4RD (— + —), E-FR (—▽—), E-BNA (—x—), E-3RN (—◊—), MX-3R (—○—).

6.3.3 Extracção da endo-PG à escala laboratorial

Apesar do factor de purificação não ser muito elevado, a extracção no SDFA PEG-sal pode ser usado como uma primeira etapa de concentração da enzima endo-PG, atendendo ao facto de a enzima se encontrar quase toda na fase inferior do sistema.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios de partição, seleccionou-se o SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação moderado, cerca de 28 %, e uma razão de volume de fases entre 8 e 11. De acordo com os resultados presentes na Figura 6.6 verificou-se também que não existe a necessidade de introduzir uma etapa de diálise antes da separação no SDFA, (uma vez que $K_p' < K_p$). Da Figura 6.3, verifica-se também que não é necessário ajustar o pH do sobrenadante da fermentação, e por outro lado, conforme resultados da secção 4.3.4 a enzima é estável durante pelo menos uma semana

sem a adição de nenhum tampão.

Tendo em conta os resultados obtidos na partição, é proposto um esquema simples de extracção (Figura 6.8). Este esquema consiste numa centrifugação seguida do SDFA. Depois do SDFA, a fase inferior rica em enzima é dialisada para a remoção de sais e congelada para armazenamento da enzima endo-PG.

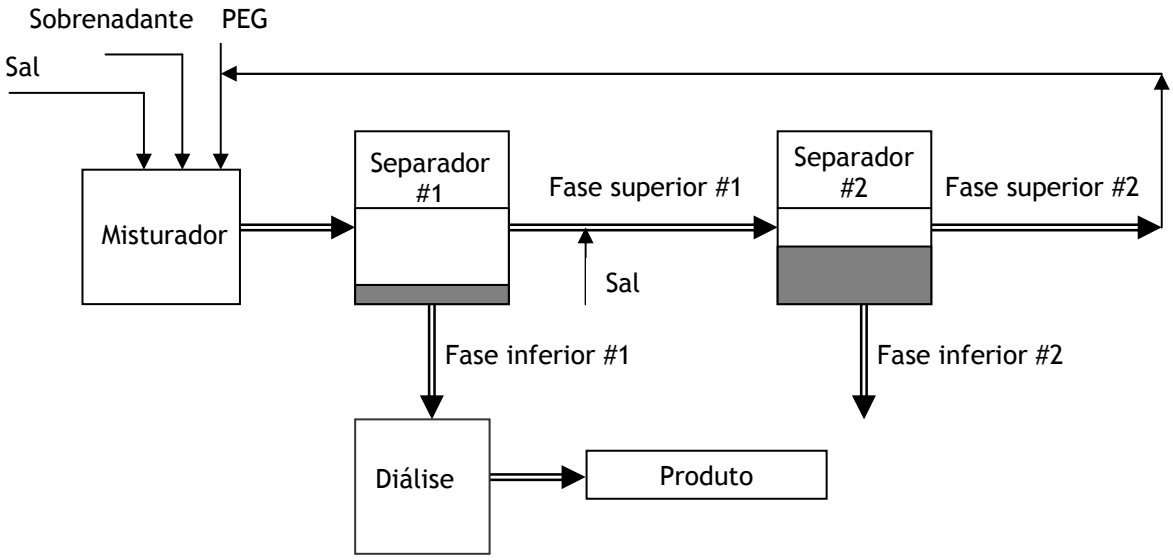


Figura 6.8 Representação esquemática da extracção da enzima no SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação moderado, cerca de 28 %, e uma razão de volume de fases entre 8 e 11.

O SDFA é realizado entre duas linhas de ligação como representado na Figura 6.9 e composto por 2 etapas: a primeira consiste na concentração da endo-PG no SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação de 28% e uma razão do volume de fases entre 8 e 11 (ponto P na Figura 6.9), e a segunda etapa é a concentração da fase superior rica em PEG, para se efectuar a reciclagem deste, por adição de sal que dá origem a um novo sistema PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ cujo comprimento da linha de ligação é cerca de 58-60 % (ponto Q). A enzima é recolhida na fase inferior do primeiro SDFA (ponto B). A fase superior

recolhida no segundo SDFA (ponto C) é utilizada para recuperação do PEG e nova introdução no SFDA (construção de novo ponto P).

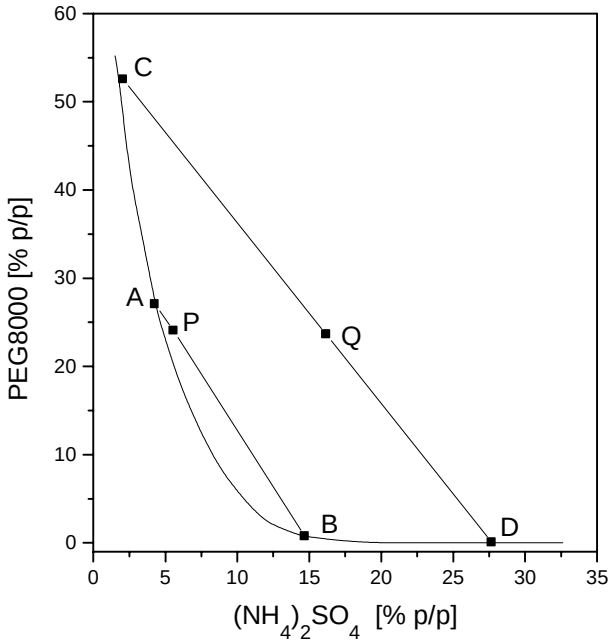


Figura 6.9 Representação esquemática das duas linhas de ligação usadas para extracção da enzima. P representa o ponto de operação para o primeiro SDFA. A e B representam a composição das fases superior e inferior. Q, C e D são os pontos correspondentes ao segundo SDFA. Q é ponto de operação, C e D representam a composição das fases superior e inferior, respectivamente. A enzima é recuperada em B.

O objectivo do segundo SDFA não é só remover a água da solução de PEG, mas também remover a maioria dos contaminantes da fase superior do primeiro SDFA. A diálise é usada para remover o sal presente na fase inferior da primeira etapa.

Para testar a operacionalidade do sistema presente na Figura 6.8 foram realizados alguns ensaios. No primeiro ensaio, após a remoção de células por centrifugação, colocou-se 35 mL de sobrenadante de fermentação, cuja concentração total de proteína era 11,6 $mg.L^{-1}$ e a actividade enzimática de 1,74 $U.mL^{-1}$, numa ampola de extracção. A esta ampola adicionou-se 51 g de

uma solução de reserva de PEG8000 (50 %) e 12,5 g de uma solução de reserva de $(NH_4)_2SO_4$ (40 %), de modo a formar uma mistura com 100 g. Esta mistura foi agitada vigorosamente e o SDFA formado apresentava uma razão de volume de fases de 11 e um comprimento da linha de ligação de 28 %. Após a extracção, foram recolhidos 7,7 mL de fase inferior que possuía uma concentração de proteína total e uma actividade enzimática de 41,1 $mg.L^{-1}$ e 7,51 $U.mL^{-1}$, respectivamente. No segundo ensaio, juntou-se 69,5 mL de sobrenadante da fermentação a 25,5 g de PEG sólido e 5,1 g de sal sólido de modo a construir um sistema com 100 g. No terceiro ensaio, juntou-se 46,5 g de PEG, resultante da concentração da fase superior de 3 ciclos de extracção (a concentração de PEG era cerca de 52,5%), a 1,0 g de PEG sólido, a 48,5 mL de sobrenadante da fermentação e a 4,4 g de sal sólido. O sistema construído possui uma razão de volume de fases de cerca de 8-10 e um comprimento de linha de ligação de 28 %. O quarto ensaio foi similar ao terceiro ensaio. Os resultados obtidos para estes 4 ensaios estão presentes na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 Resultados obtidos para os ensaios à escala laboratorial utilizando o esquema proposto na Figura 6.8

Esquema separação *	Volume (mL)	Prot. Total (m)	Recup. Prot. (%)	Act. Total (U)	Act. Espec. ($U.mg^{-1}$)	Recup. Enzima (%)	Factor de purificação cumulativo
Sobrenadante	35,0	0,406	100,0	60,9	153,4	100,0	
SDFA com PEG e Sal solução stock	7,7	0,316	77,8	57,8	182,9	94,9	1,22
Diálise	12,9	0,233	57,3	58,2	249,8	95,6	1,67
Sobrenadante	69,5	0,632	100,0	221,1	349,8	100,0	
SDFA com PEG e sal sólido	7,8	0,486	76,9	209,4	430,9	94,7	1,23
Sobrenadante	48,5	0,441	100,0	154,2	349,7	100,0	
SDFA com sal sólido e solução PEG após 3 ciclos	8,2	0,345	78,3	150,0	434,8	97,3	1,24
Diálise	13,1	0,257	58,2	150,5	585,6	97,6	1,68
Sobrenadante	48,5	0,441	100,0	154,2	349,7	100,0	
SDFA com sal sólido e solução PEG após 4 ciclos	10,0	0,347	78,7	152,5	438,6	98,9	1,26

* O SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ usado possui uma razão de volume de fases de cerca 8-10 e um comprimento de linha de ligação de 28 %.

Como pode ser verificado, em todos os ensaios e depois do SDFA, atingiu-se valores de recuperações (rendimentos) de cerca de 78 % para a proteína total e cerca de 95 % para a enzima endo-PG. Foi também obtido uma concentração final da enzima de cerca de 5 até 8 vezes mais que a presente no sobrenadante da fermentação. O factor de purificação manteve-se constante em 1,25, independentemente da origem do PEG utilizada.

Relativamente à recuperação do PEG verificou-se que mais de 95 % do PEG presente na fase superior do primeiro SDFA pode ser recuperado, uma vez que na fase inferior desse mesmo sistema a sua concentração é muito baixa (< 1 %).

Na fase inferior do primeiro SDFA (fase onde se encontra a enzima) a concentração de sal é muito elevada (cerca de 1 M) e também existem algumas proteínas de baixo peso molecular (inferior a 14000 Da). Para separar a enzima destas substâncias efectua-se a diálise. Verificou-se que não existem perdas de enzima com este processo, o que permitiu aumentar o factor de purificação para 1,3 que corresponde um factor de purificação cumulativo de cerca 1,68.

6.3.4 Partição da enzima nos sistemas PEG-PVA

O comportamento da partição da enzima endo-PG e da proteína total em SDFA PEG-PVA e PEG- Reppal PES100 foi estudado. A solução da enzima usada foi a solução A (sobrenadante da fermentação liofilizado e concentrado 8 vezes).

Para os sistemas PEG8000-PVA e PEG20000-PVA, a enzima endo-PG é concentrada na fase superior e a proteína é concentrada na fase inferior, conforme Figura 6.10 e Figura 6.11. Os coeficientes da partição, para enzima e proteína, variam de 3,0 a 6,5 e de 0,36 a 0,75, respectivamente.

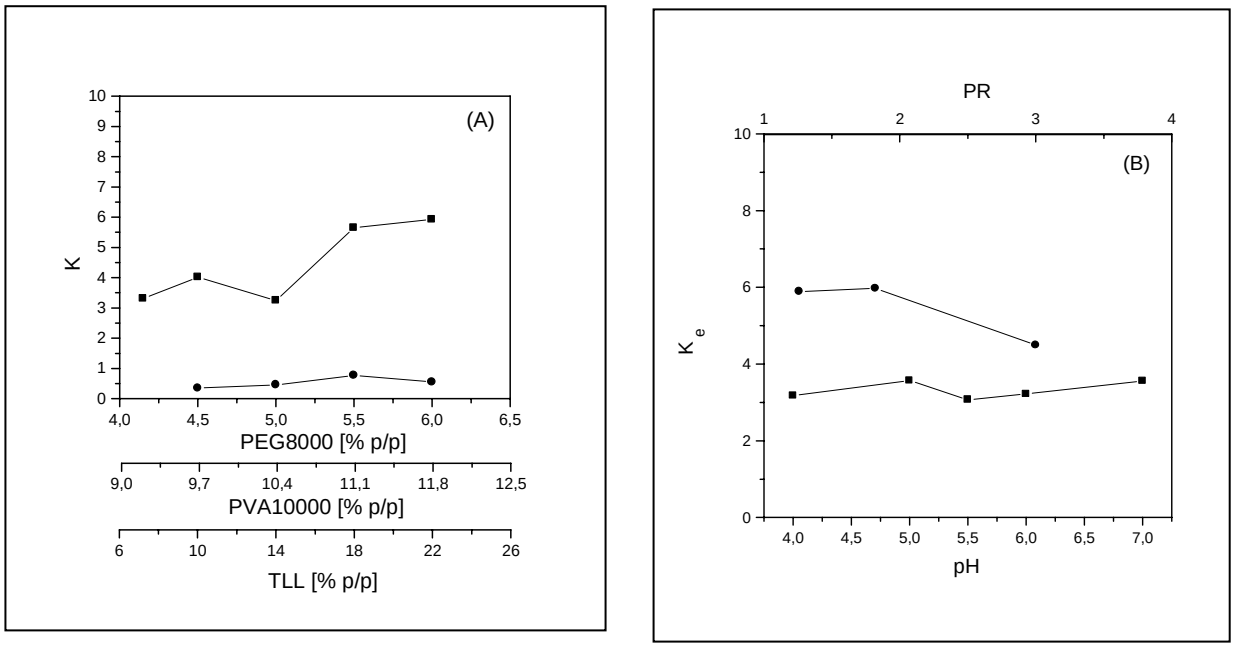


Figura 6.10 Partição da endo-PG (K_e) e proteína total (K_p) no SDFA PEG8000-PVA. (A) Efeito da concentração do polímero e comprimento da linha de ligação K_e (—■—) e K_p (—●—). (B) Efeito do pH (—■—) e razão do volume de fases (—●—). O SDFA utilizado para avaliar o efeito do pH na partição da enzima foi 4,5 % PEG-9,7 % PVA; os tampões usados foram 25 mM tampão citrato para pH <5,5 e 25 mM tampão fosfato (pH≥5,5). A avaliação do efeito da razão do volume de fases foi estudada num sistema cujo comprimento da linha de ligação foi de 20 %.

Conforme se pode verificar, enquanto que a massa molecular do PEG tem pouca influência na partição da enzima e da proteína total, a concentração de polímero afecta significativamente a partição da enzima. O coeficiente de partição da enzima é cerca de 3 até que a composição do SDFA atinja os valores 5 % PEG8000-10,4 % PVA e 4 % PEG20000-9 % PVA. Para composições mais elevadas, o coeficiente de partição aumenta, à medida que aumenta a concentração do polímero, até atingir o valor de 6.

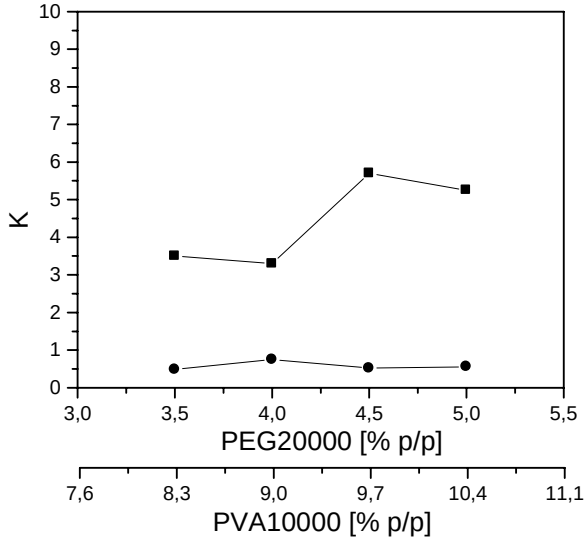


Figura 6.11 Partição da endo-PG, K_e (—■—) e proteína total, K_p (—●—) no SDFA PEG20000-PVA.

Para testar a influência do pH usou-se o SDFA de composição 4,5 % PEG-9,7 % PVA. Este sistema foi tamponado a diferentes pH´s usando tampão citrato 25 mM, para pH<5,5, e tampão fosfato, para pH≥5,5. Os resultados (Figura 6.11(B)) mostram que o pH tem pouca influência na partição da enzima, o que indica que as cargas na superfície da enzima têm pouca contribuição para a partição da enzima. Verifica-se também que a razão de volume de fases contribui pouco para a partição da enzima (usou-se um comprimento da linha de ligação de 20 %). Contudo, o coeficiente de partição decresce ligeiramente quando a razão de volume de fases excede o valor 2.

Relativamente aos resultados partição da endo-PG e proteína total no SDFA PEG8000-Reppal PES100, apresentados na Figura 6.12, verifica-se que quer a enzima quer a proteína total tendem a ser distribuídas de igual forma na fase superior e inferior, cujos coeficientes variam de 0,75 até 0,5 e de 0,95 até 0,80, respectivamente. Para analisar o comportamento da partição da enzima em função do pH usou-se os mesmos tampões e verificou-se que o pH também

não interfere grandemente no comportamento de partição da enzima. Estes resultados evidenciam que o sistema PEG8000-Reppal PES100 não é adequado para utilizar na extracção da enzima.

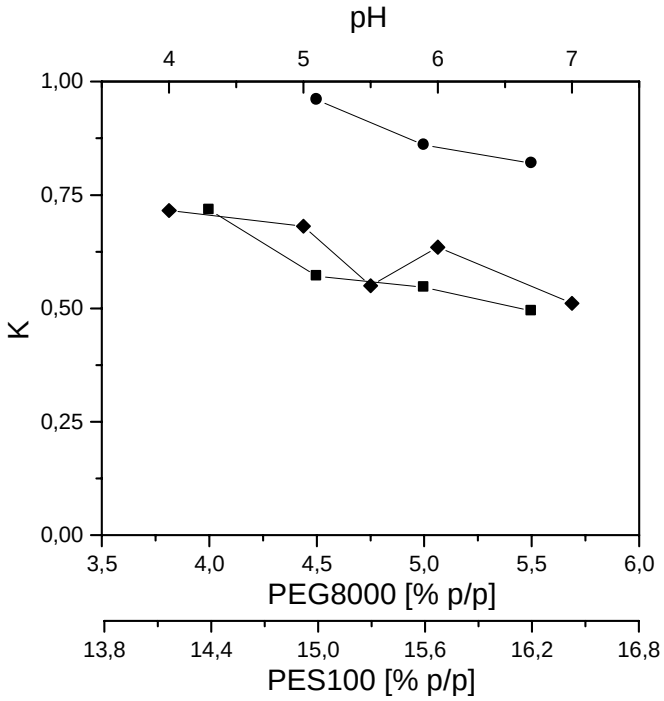


Figura 6.12 Partição da endo-PG, K_e (—■—) e proteína total, K_p (—●—) no SDFA PEG8000-PES100. A partição da enzima em função do pH (—♦—) foi estudado no SDFA 4,5 % PEG-15 % Reppal PES100 utilizando o tampão citrato para pH<5,5 e o tampão fosfato para pH≥5,5.

6.3.5 Esquema de separação para extracção da enzima

Baseado nos resultados anteriores, em que se verificou que se obtinha valores razoáveis de purificação no sistema PEG-$(NH_4)_2SO_4$ e que no SDFA PEG8000-PVA10000 se poderia proceder à concentração da mesma, é proposto um esquema de separação para a enzima endo-PG usando, como fonte de enzima, o sobrenadante da fermentação. Este esquema apresentado na Figura 6.13 consiste em 3 etapas de extracção e uma diálise no final: a primeira etapa tem como objectivo a separação da enzima das outras proteínas (purificação); a

segunda etapa consiste na concentração da endo-PG e a remoção dos polímeros constituintes da fases e, finalmente, a terceira etapa tem como objectivo a reciclagem do PEG. A finalidade da diálise é a remoção de sais e outros subprodutos resultantes da fermentação.

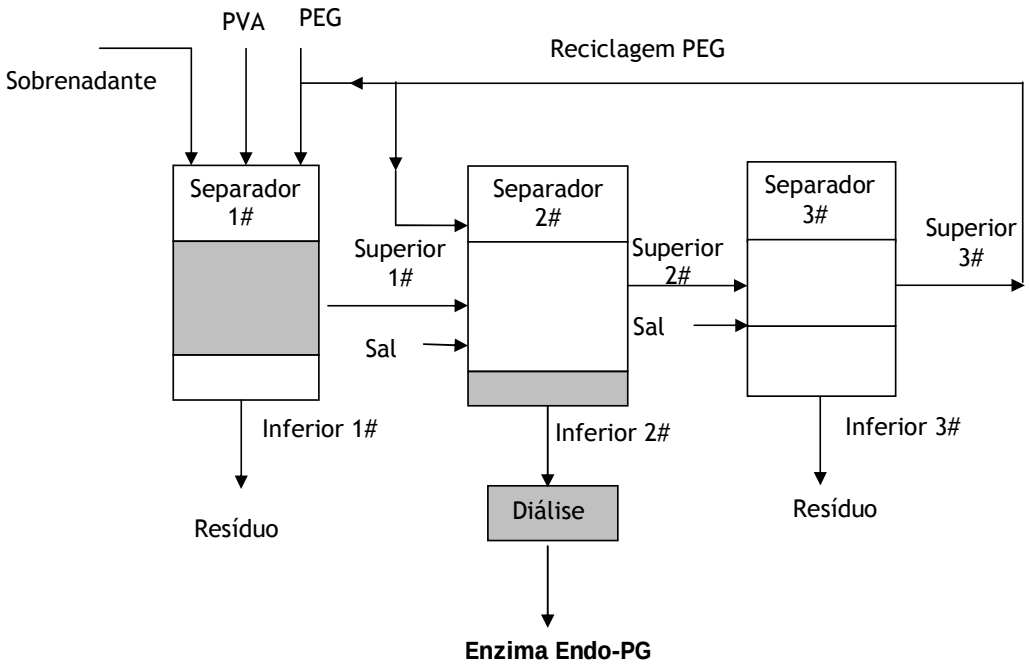


Figura 6.13 Representação do esquema de separação proposto. A primeira etapa foi realizada num SDFA 6,9 % PEG8000-8,7 % PVA cuja razão de volume de fases é cerca de 2 e o comprimento da linha de ligação é cerca de 20 %. A segunda etapa foi realizada num SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ com uma razão de volume de fases entre 8 e 10 e um comprimento de linha de ligação de 28%. Esta etapa permitiu a recuperação de quase toda a enzima na fase inferior rica em sal. Na terceira etapa foi adicionada $(NH_4)_2SO_4$ à fase superior da segunda etapa, de forma a atingir-se a separação das fases. A fase superior deste terceiro SDFA, rica em PEG, foi reintroduzida na primeira etapa da separação.

A primeira extracção foi realizada no SDFA preparado por mistura de 6,9 g de PEG sólido a 29 g de uma solução reserva de PVA 30 % e 64,1 g de sobrenadante de fermentação. Esta solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos. O SDFA assim obtido corresponde a 6,9 % PEG8000-8,7 % PVA cuja razão de volume de fases é cerca de 2 e o comprimento da linha de ligação é cerca de 20 %. Esta etapa permitiu a recuperação na fase superior do sistema (67 g) de cerca de 91% da enzima endo-PG inicialmente introduzida no separador.

Tabela 6.8Resultados obtidos na extracção da enzima endo-PG utilizando o esquema de separação proposto na Figura 6.13

Etapa de extracção	Volume (ml)	Proteína Total (mg)	Recup. Proteína (%)	Act. Total (U)	Recup. Enzima (%)	Factor purificação /Factor concentração
Sobrenadante fermentação	113,3	1,575	100	261,7	100	
SDFA 6,9 % PEG-8,7 % PVA, Fase superior	128,0	0,903	57,3	238,1	91,0	1,60 / 0,88
SDFA 25 % PEG-5,2 % $(NH_4)_2SO_4$, Fase inferior	21,6	0,764	48,5	237,7	90,8	1,87 / 5,2 *
Diálise	37,7	0,756	48,0	239,4	91,5	

* factor de purificação e concentração cumulativos

A segunda etapa de separação foi preparada por adição à fase superior recolhida na primeira etapa de 1,35 g de PEG sólido e 0,395 g de $(NH_4)_2SO_4$, obtendo-se, assim, um sistema com uma razão de volume de fases entre 8 e 10 e um comprimento de linha de ligação de 28 %. A separação das fases de SDFA ocorreu após centrifugação, a 3000 rpm, durante 5 minutos, sendo a enzima recolhida na fase inferior. Esta etapa para além de permitir a concentração da enzima numa fase rica em sal também permite a remoção do PEG e a redução do volume da solução, beneficiando a concentração da endo-PG. Após esta segunda etapa de extracção, a recuperação da enzima decresceu ligeiramente para 90,8 %, com um factor de purificação de 1,87 e um factor de concentração de 5,2. A diálise da solução foi também testada com o objectivo de se

apresentar uma solução enzimática livre de sal. Verificou-se que não houve perdas em termos de recuperação de enzima, apenas um decréscimo em termos de factor de concentração.

A terceira etapa foi introduzida tendo como objectivo a reciclagem do PEG. Este polímero encontra-se presente em grandes quantidades na fase superior dos dois SDFA anteriormente descritos, uma vez que as concentrações de PEG nas fases inferiores de ambos os sistemas é muito pequena (inferior a 1,5 % para o SDFA PEG-PVA e inferior a 0,3 % para PEG-$(NH_4)_2SO_4$). Assim, a fase superior do segundo separador pode ser introduzida no terceiro separador para concentração do PEG por adição de sulfato de amónio. Deste modo um novo SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ é formado com um comprimento de linha de ligação de cerca de 58 % a 60 %. Após a separação das fases é obtida uma fase superior com cerca de 52 % PEG, 1,5 % de sal e 1,0 % PVA. A solução de PEG reciclada é suficiente para alimentar o segundo separador e complementar as necessidades do primeiro separador. A fase inferior deste SDFA possui cerca de 27 % de sal e está livre, quer de polímeros, quer de outro tipo de substâncias.

Para analisar a pureza da enzima recolhida na fase inferior do segundo separador foi realizada uma electroforese em gel SDS-PAGE. Foram colocadas as amostras de padrões, assim como amostras da enzima concentrada e purificada (resultante da separação) e amostras do sobrenadante da fermentação. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.14.

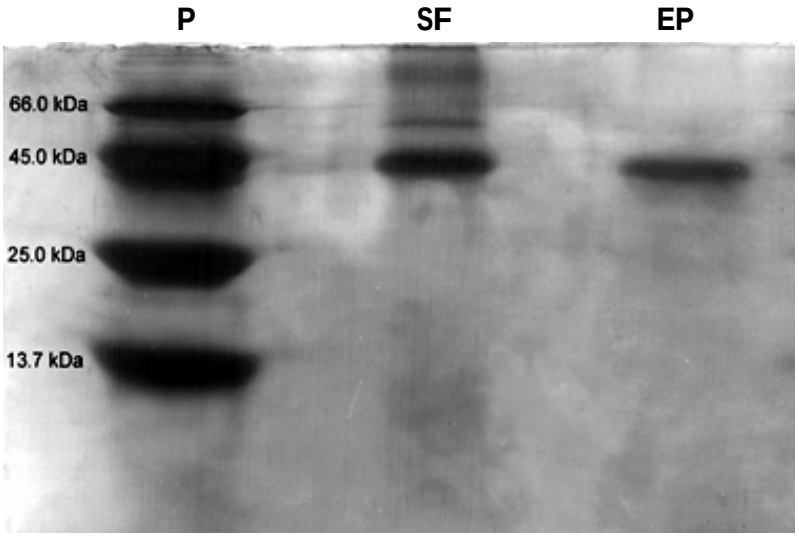


Figura 6.14 Gel de electroforese desnaturante (6.2.8) corado pelo método do nitrato de prata (6.2.9). P – Marca (albumina bovina sérica – 66 kDa, ovalbumina – 45 kDa, quimotripsinogeneo - 25 kDa, ribonuclease – 13,7 kDa), SF – amostra obtida do sobrenadante da fermentação e EP – amostra obtida na segunda etapa do processo de separação (concentrada e purificada).

Pela observação da Figura 6.14 é possível ver que a enzima recolhida na fase inferior do segundo separador é pura, uma vez que não aparecem outras bandas corrrespondentes a outras proteínas, enquanto que no sobrenadante da fermentação estão presentes outras proteínas com pesos moleculares superiores ao da enzima endo-PG.

6.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo foi extensivamente estudada a partição da enzima endo-PG nos SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$, PEG-fosfato de potássio (pH=7), PEG-PVA e PEG-Reppal PES100 e a influência de parâmetros como massa molecular e concentração do PEG, pH, razão do volume de fases e comprimento da linha de ligação foi também explorada.

Para os sistemas PEG-sal, a enzima endo-PG e a proteína total presentes no sobrenadante de fermentação são concentradas na fase inferior, rica em sal, e a maioria dos coeficientes de partição para a enzima são inferiores a 0,1. O pH

mostra uma ligeira influência na partição da endo-poligalacturonase enquanto a massa molecular, a concentração do PEG e a razão do volume de fases são parâmetros bastante importantes para a partição. O SDFA seleccionado para fazer a extracção da enzima foi o PEG-$(NH_4)_2SO_4$ com um comprimento de linha de ligação de cerca de 28% e uma razão de volume de fases entre 8 e 11.

Para além dos ensaios de partição, foi proposto um esquema de separação que consiste em dois SDFA PEG-$(NH_4)_2SO_4$ consecutivos. No primeiro SDFA recolhe-se a enzima na fase inferior rica em sal. Obtém-se uma recuperação de enzima superior a 95 %, uma concentração entre 5 e 8 vezes e ainda um factor de purificação de 1,25. Com a utilização da diálise, usada para remover o sal e outras moléculas de baixo peso molecular, obtém-se um factor de purificação final de 1,7. Atendendo ao teor de enzima em relação à proteína total no sobrenadante da fermentação, este esquema de extracção favorece mais a concentração, do que a purificação. No segundo SDFA adiciona-se sal à fase superior rica em PEG para se fazer a recuperação do polímero. Mais de 95% do PEG é reciclado sem interferir com o factor de purificação da enzima.

Para o sistema PEG8000-PVA10000, a enzima endo-PG pode ser concentrada na fase superior, rica em PEG, do sistema com um coeficiente de partição superior a 6, enquanto que proteína total predomina na fase inferior rica em PVA. Este facto indica que a purificação da enzima pode ser conseguida com a utilização deste SDFA. Entretanto, como no SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ a enzima migra para a fase inferior rica em sal, este sistema pode ser usado para se proceder à concentração. Integrando estas duas extracções foi proposto um outro esquema de separação. Os resultados mostram que mais de 91 % da enzima endo-PG pode ser recuperado, com um factor de concentração de 5,2 e um factor de purificação de 1,87, que vai de encontro aos resultados encontrados no capítulo 4, que revelam que entre 40 a 50 % da proteína total é enzima.

Cerca de 90 % do PEG utilizado pode ser recuperado, com um consumo extra de $(NH_4)_2SO_4$. O PEG reciclado não representa nenhuma perda em termos de recuperação e purificação de enzima.

Tendo os SDFA como característica a facilidade do aumento de escala, os dois

esquemas de separação propostos evidenciam que este método pode ser bastante poderoso para a extracção da enzima endo-PG do sobrenadante da fermentação.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertsson, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules. 3rd ed. John Wiley and Sons, New York. 1986.

Almeida, M. C., Venâncio, A., Teixeira, J. A. e Aires-Barros, M. R. Cutinase purification on poly(ethylene glycol) – hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*. 711, 151-159. 1998.

Barnby, F. M., Morpeth, F. F. e Pyle, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus.* I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 12, 891-897. 1990.

Blum, H., Hildburg, B. e Gross, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99. 1987.

Fisher, D. e Sutherland, I. A. Separations using aqueous phase systems: applications in cell biology and biotechnology. Plenum, New York. 1989.

Harsa, S., Zaror, C.A. e Pyle, D.L. Production of polygalacturonases from Kluyveromyces marxianus fermentation: preliminary process design and economics. *Process Biochemistry*. 28,187–195. 1993.

Harsa, S. Studies on the ion-exchange of pectinase. Universisty of Reading, United Kingdom. PhD thesis. 1991.

Johansson, G. e Tjerneld, F. Affinity partition between aqueous phases - a tool for large-scale purification of enzymes. Journal of Biotechnology. 11, 135-142. 1989.

Lin, D. Q., Zhu, Z. Q. e Mei, L. H. Affinity extraction of lactate dehydrogenase by aqueous two-phase systems using free triazine dyes. *Biotechnology Techniques*. 10, 41-46. 1996.

Patching, J. W. e Rose, A. H. The effects and control of temperature. Em: Methods in Microbiology. Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (eds). Academic Press, London. Vol 2, pág. 23-38. 1969.

Patel, K., Easty, D. J. e Dunn, M. J. Detection of proteins in polyacrylamide gels using an ultrasensitive silver staining technique. *In*: *Methods in molecular biology: new protein techniques*, JM Walker (Ed), pp.159-168: Humana Press, New Jersey. 3ª Edição. 1988.

Persson, J., Nyström, L., Ageland, H. e Tjerneld, F. Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature-induced phase separation. *Biotechnology and Bioengineering*. 65, 371-381. 1999.

Schwan, R. F., Cooper, R. M. e Wheals, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. 21, 234-244. 1997.

Schwan, R. e Rose, A. H., Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. J*ournal of Applied Bacteriology*. 76, 62-67. 1994.

Sturesson, S., Tjerneld, F. e Johansson, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol). Applied Biochemistry and Biotechnology. 26 (3) 281-295. 1990.

Venâncio, A. Caracterização de novos sistemas para partição bifásica aquosa de biomoléculas. Dissertação de Doutoramento. Universidade do Minho, Portugal. 1996.



Capítulo 7

Separação da enzima com SDFA com polímeros termossensíveis

155	7	Separação da enzima com SDFA com polímeros termossensíveis
157	7.1	Introdução
158	7.2	Materiais e Métodos
158	7.2.1	Reagentes
158	7.2.2	Produção da enzima endo-poligalacturonase
158	7.2.3	Preparação da solução de enzima e SDFA para os ensaios de partição no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$
159	7.2.4	Preparação da solução de enzima e SDFA para os ensaios de Separação no Sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$
159	7.3	Resultados e Discussão
159	7.3.1	Partição da enzima endo-poligalacturonase
162	7.3.2	Separação da enzima enpoligalacturonase
171	7.4	Conclusões
172	7.5	Referências bibliográficas

Neste capítulo utilizou-se os SDFA para extrair a enzima endo-poligalacturonase poduzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. Em relação ao capítulo anterior foi introduzido, para construção dos sistemas, o polímero termossensível Ucon 50-HB-5100 (Ucon), um copolímero aleatório composto por 50 % óxido etileno (EO) e 50 % óxido de propileno (PO). Foi estudada a influência dos parâmetros composição do sistema e comprimento da linha de ligação para o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ e composição do sistema para Ucon-PVA10000 e Ucon-Reppal PES100. Investigou-se, também, a recuperação do Ucon. O SDFA Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ mostrou-se o mais eficiente para a extracção da enzima através dos SDFA, verificando-se que a enzima migra para a fase rica em sal.

Propôs-se um esquema de separação composto por três etapas, utilizando o SDFA Ucon-$(NH_4)_2SO_4$. O esquema foi testado à escala laboratorial. Na primeira e segunda etapas, realizadas em série, as extracções foram realizadas utilizando o mesmo SDFA Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, e paralelamente a cada uma destas extracções fez-se a recuperação do Ucon. Na terceira etapa procedeu-se à remoção do Ucon e de resíduos de sal presentes na fase rica em enzima da segunda extracção. O esquema proposto permitiu atingir um factor de concentração da enzima de 10 e um factor de purificação próximo do máximo esperado, mantendo sempre mais de 95 % da actividade enzimática inicial.

7.1 INTRODUÇÃO

Como foi referido no capítulo anterior os SDFA oferecem um ambiente suave para a extracção de biomateriais (Albertssson, 1986; Fisher and Sutherland, 1989), uma vez que ambas as fases contêm cerca de 70-90 % de água (Walter e Johansson, 1994). Os resultados apresentados no capítulo 6 mostraram a possibilidade de utilizar os sistemas PEG-$(NH_4)_2SO_4$, PEG-PVA10000 e/ou uma combinação destes dois SDFA para purificar e concentrar a enzima endo-PG. Contudo, algumas dificuldades aparecem quando se pensa nos custos associados à extracção da enzima. Foi proposto a recuperação do PEG através de um consumo extra de sal (por adição de mais sal, o PEG pode concentrar-se numa fase de um novo SDFA), enquanto que a recuperação do PVA é difícil de se efectuar.

O PEG pode ser, também, separado pelas suas características termossensíveis, contudo os custos envolvidos poderiam ser mais elevados que os associados à recuperação do PEG por adição de mais sal, uma vez que o ponto de turvação do PEG é superior é 180 ºC para massa moleculares baixas, e decresce com o aumento da massa molecular, atingindo o valor aproximado de 95 ºC para massa moleculares de 200000 Da ou superiores.

Os SDFA construídos com polímeros termossensíveis têm sido largamente utilizados. A maioria dos sistemas é construído utilizando um copolímero aleatório de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) (Harris et al., 1991). Este copolímero possui um ponto de turvação de 47 ºC, tornando possível a separação das fases com o aumento da temperatura (Harris et al., 1991; Zhu et al., 2002) e o polímero pode ser recuperado (Persson et al, 1999). Nestes polímeros o ponto de turvação está directamente relacionado com a percentagem de PO no polímero (Johansson et al., 1993; Cunha et al., 1998).

No trabalho presente neste capítulo procurou-se as melhores condições para fazer a extracção da enzima endo-PG em sistemas construídos com Reppal PES100, PVA e $(NH_4)_2SO_4$ como formadores de uma das fases e o copolímero

aleatório Ucon como formador da outra fase. Foi proposto um esquema de separação da enzima com recuperação do Ucon.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Reagentes

Para construção dos diagramas de fases foram previamente preparadas soluções reserva dos vários reagentes utilizados: PVA, Reppal PES100, Ucon 50-HB-5100, $NH_2(SO_4)$, conforme descrito na secção 3.3.1.

7.2.2 Produção da enzima endo-poligalacturonase

A enzima endo-poligalacturonase foi obtida por fermentação das estirpes *Kluyveromyces marxianus* CCT3172 ou CH0-1 ou CH4-1. A fermentação foi realizada em frascos rolhados, a 30 ºC, com a seguinte composição do meio: 3,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 4,5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0,25 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$, 0,25 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$ e 1,0 $g.L^{-1}$ de extracto de levedura. Foram utilizadas várias fontes de carbono como glucose (10 ou 30 $g.L^{-1}$) ou sacarose (10 $g.L^{-1}$) ou melaço de cana (10 $g.L^{-1}$, representa a concentração em sacarose).

7.2.3 Preparação da solução de enzima e SDFA para os ensaios de partição no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$

A solução de enzima endo-poligalacturonase foi obtida a partir da fermentação realizada pela estirpe *K. marxianus* CCT 3172, no meio de cultura referido em 7.2.2 com 10 $g.L^{-1}$ de glucose como fonte de carbono. A biomassa foi removida do meio de cultura por centrifugação, e o sobrenadante foi dializado utilizando uma membrana de porosidade 14000 Da e seguidamente liofilizado. As soluções finais de enzima foram obtidas por dissolução do resíduo seco em água destilada, de forma a ficar cerca de 8 vezes mais concentrada que a amostra inicial recolhida após a fermentação.

Na preparação dos SDFA usou-se quantidades adequadas de soluções de reserva de polímero e de sal. De seguida, adicionou-se 0,2 mL de solução de enzima concentrada e água para perfazer 1 g de solução total. Após agitação, a solução centrifugou-se, a 3000 rpm, durante 3 minutos e colocou-se na estufa durante 14 horas às temperaturas de ensaio (22, 30 e 40 ºC) para garantir que o equilíbrio foi atingido.

De seguida, foram recolhidas amostras da fase inferior e da fase superior para quantificar a actividade enzimática e a proteína (de acordo com metodologia descrita em 3.2.1 e 3.2.3 (método de Bradford), respectivamente).

7.2.4 Preparação da solução de enzima e SDFA para os ensaios de separação no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$

As amostras utilizadas nos ensaios de extracção da endo-PG nos sistemas Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, foram recolhidas do sobrenadante da fermentação, e não sofreram qualquer outro tipo de tratamento.

Para preparar o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ adicionou-se sal sólido e o polímero puro ao sobrenadante da fermentação, cerca de 64 % a 72 % do sistema total. Nos casos em que foi utilizado o polímero recuperado para formar as fases, adicionava-se uma quantidade de polímero puro de forma a atingir a concentração desejada do mesmo.

A mistura agitou-se vigorosamente e colocou-se numa estufa à temperatura desejada (22, 30 ou 40 ºC). Por último, recolheram-se as fases com a ajuda de uma micropipeta de forma a quantificar a actividade enzimática e a proteína (ver secção 3.2.1 e 3.2.3 (método de Bradford)).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Partição da enzima endo-poligalacturonase

Os coeficientes de partição da enzima e da proteína total, K_e e K_p, são usualmente definidos como o razão entre a actividade enzimática ou concentração da proteína na fase superior em relação à fase inferior. Contudo, no caso do sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, uma vez que ocorre inversão de fases a temperaturas altas (30 e 40 ºC), os coeficientes de partição são redefinidos como a razão entre a actividade enzimática ou concentração de proteína na fase rica em Ucon em relação à fase rica em sal.

A enzima endo-poligalacturonase mostrou uma forte tendência para se concentrar na fase rica em sal, no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC, como é apresentado na Figura 7.1.

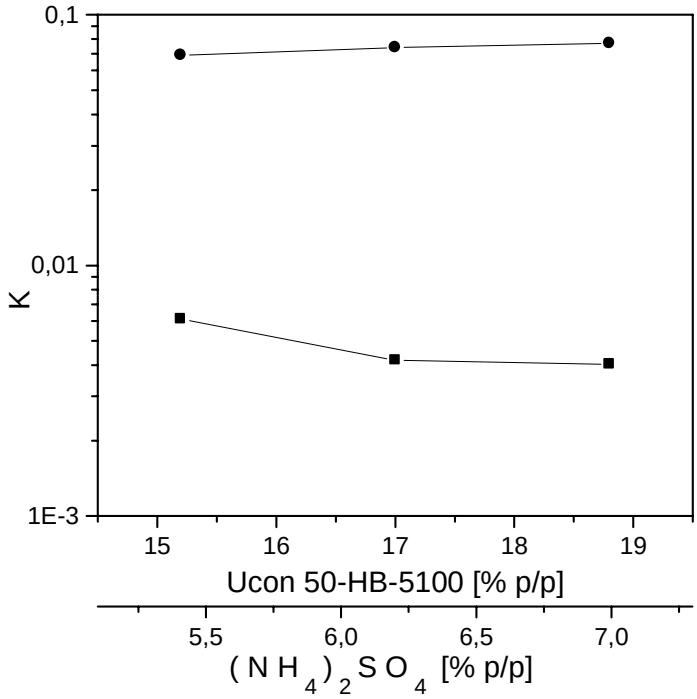


Figura 7.1 Partição da enzima endo-PG (K_e) e da proteína total (K_p) no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 22 ºC. K_e (—▪—) e K_p (—•—).

O coeficiente de partição para a enzima diminui à medida que aumenta a concentração de polímero e de sal, chegando a atingir o valor de 0,004.

A partição da proteína total, obtida no sobrenadante da fermentação da estirpe *K. marxianus* CCT 3172, foi também quantificada e está presente na Figura 7.1. Verifica-se que o coeficiente de partição da proteína mantém-se constante, próximo de 0,07, para sistemas cujas concentrações variam de 15,2 % Ucon-5,4 % sal até 18,8 % Ucon-7,0 % sal (comprimento da linha de ligação de 22 até 40 %). A diferença no coeficiente de partição entre a endo-PG e a proteína total mostra a possibilidade da utilização deste sistema na purificação da enzima.

Foram também realizadas experiências de partição da enzima e proteína total, obtidas por fermentação da mesma estirpe, *K. marxianus* CCT 3172, no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ a 30 e 40 ºC. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 Efeito da temperatura nos coeficientes de partição da endo-PG e proteína total

Temperatura	**22°C**	**30°C**	**40°C**
Sistema	**27.6 % Ucon-3.2 % sal**	**27.0 % Ucon-2.4 % sal**	**29.5 % Ucon-1.4 % sal**
TLL	29.8	27.7	30.1
K_e	$4{,}98\times10^{-3}$	$4{,}65\times10^{-3}$	$3{,}68\times10^{-3}$
K_p	$7{,}14\times10^{-2}$	$6{,}90\times10^{-2}$	$6{,}41\times10^{-2}$

Como se pode observar na tabela, aumentando a temperatura, diminuem ligeiramente os valores de K_e e K_p, quando o comprimento da linha de ligação dos sistemas se mantém dentro do mesmo valor.

Relativamente à partição da enzima e proteína nos sistemas Ucon–Reppal PES100 e Ucon–PVA10000, apresentados na Figura 7.2, verifica-se que partição da endo-PG distribui-se de igual modo em ambas as fases, ou a partição da enzima e proteína não diferem, o que indica que estes sistemas não são adequados para a separação da enzima.

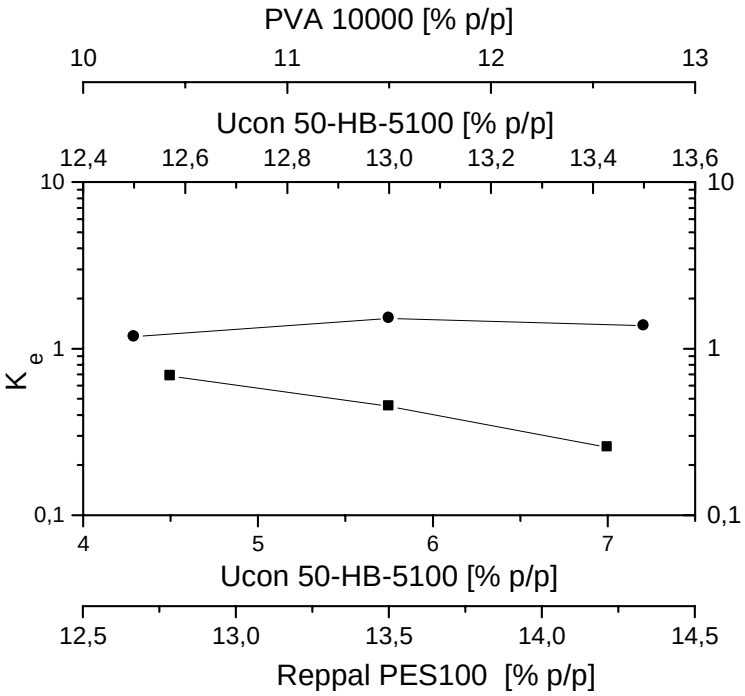


Figura 7.2 Partição da endo-PG (K_e) nos sistemas Ucon-PVA10000 (—•—) e Ucon–Reppal PES100 (—▪—), a 22 °C.

7.3.2 Separação da enzima enpoligalacturonase

Caracterização do procedimento de extracção no SDFA Ucon-$(NH_4)_2SO_4$

A separação da enzima endo-PG, em sistemas de duas fases aquosas, foi realizada à escala industrial para determinar a eficiência de separação e encontrar as condições óptimas de recuperação da enzima do sobrenadante da fermentação.

Foram utilizados SDFA a 22 , 30 e 40 ºC para realização das experiências. Estes sistemas foram construídos usando polímero fresco ou polímero recuperado, e possuíam sempre o mesmo TLL (cerca de 28 %) e a mesma razão de volumes de fases (5 a 7).

Foram utilizados os sobrenadantes das fermentações das estirpes *K. marxianus* CH4-1, CCT 3172 e CH0-1 para os ensaios realizados a 22 ºC e 30 ºC. A fonte de

carbono utilizada foi glucose, sacarose ou melaço de cana, em concentrações de 10 $g.L^{-1}$ ou 30 $g.L^{-1}$ (no caso do melaço de cana, 10 $g.L^{-1}$ representa a concentração de sacarose). A 40 ºC realizou-se somente um ensaio de separação. Neste caso, a fermentação foi realizada com a estirpe CCT 3172, com 10 $g.L^{-1}$ de glucose como fonte de carbono.

Todas as condições de fermentação assim como os resultados obtidos nos vários ensaios de separação estão sumariados na Tabela 7.2. São também apresentados os resultados obtidos no capítulo 4 e que representam o teor de enzima em relação à proteína total.

Tabela 7.2 Resultados de separação da enzima endo-PG e proteína no sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$

Sobrenadante da fermentação						SFDA[a]			Depois do SDFA				
Estirpe	**Substrato[b] ($g.L^{-1}$)**	**V (mL)**	**Act. ($U.mL^{-1}$)**	**Proteína ($mg.L^{-1}$)**	**endo-PG (%)[c]**	**Ucon[d] (%)**	**$(NH_4)_2SO_4$ (%)**	**T (º C)**	**Fase rica enzima**	**V (mL)**	**Recup. Actividade (%)**	**Recup. Proteína (%)**	**Factor concentração[e]**
CH4-1	30 glucose	55,7	5,13	42,4		27,6 (0)	3,0			11,6	98,7	74,5	4,8
CCT 3172	10 glucose	52,5	0,52	13,3	52 ± 10	27,6 (2)		22	Inferior	12,3	99,5	71,7	4,3
CH0-1	10 melaço	55,7	0,86	na	na	27,6 (0)				14,0	97,9	na	4,0
						Segunda etapa SDFA[f]				12,8	95,6	na	4,4
CH4-1	30 glucose	56,7	5,13	42,4		27,0 (0)	2,2			12,3	97,3	74,2	4,6
CCT 3172	10 glucose	53,4	0,59	12,7	52 ± 10	27,4 (3)	2,1	30	Superior	9,7	97,1	72,2	5,5
						Segunda etapa SDFA[f]				10,8	95,8	60,2	4,9 (1,6)
CH0-1	10 sacarose	53,4	3,40	20,0	79 ± 10	27,0 (4)	2,2			12,2	97,4	85,0	4,4
						Segunda etapa SDFA[f]				14,3	95,6	79,8	3,7 (1,2)
CCT 3172	10 glucose	57,2	0,55	12,4	52 ± 10	27,3 (0)	1,3	40	Superior	14,5	99,0	76,0	3,9

[a)] A mistura total perfaz 100 g.

[b)] No caso do melaço de cana, 10 $g.L^{-1}$ representa a concentração de sacarose.

[c)] Representa percentagem de enzima em relação à proteína total. Valores obtidos por filtração em gel.

[d)] O número entre parêntesis é número de recirculações do polímero, "0" indica que o polímero foi usado pela primeira vez, "1" para a primeira recirculação do polímero e assim sucessivamente

[e)] O factor de concentração é cumulativo. Os números entre parêntesis representam o factor de purificação depois das duas etapas do SDFA.

[f)] Na segunda etapa do SDFA foi usado polímero fresco ou recuperado, para juntar à fase rica em sal (rica em enzima), do primeiro passo do SDFA.

Para qualquer um dos três SDFA testados, depois da primeira etapa de separação, consegue-se atingir uma recuperação da enzima superior a 97 % e um factor de concentração, definido como a razão entre o volume de sobrenadante da fermentação usado e o volume da fase rica em enzima, entre 4 e 6.

A recuperação da enzima e o factor de concentração são ligeiramente afectados pela temperatura de operação, a reutilização de polímero, origem do sobrenadante da fermentação (estirpes e substratos diferentes) e da actividade enzimática (que varia de 0,5 até 5 $U.mL^{-1}$). Para a recuperação da proteína total e para o factor de purificação, os resultados estão fortemente dependentes da percentagem de enzima em relação à proteína total no sobrenadante original. Por exemplo, para os sobrenadantes da fermentação produzidos pelas estirpes CH4-1 e CCT 3172 (que possuem uma percentagem de enzima em relação à proteína total muito semelhante, cerca de 50%) conseguiu-se obter uma recuperação de proteína de cerca de 72 a 76 %, numa etapa de separação.

Uma vez que a purificação da enzima não foi satisfatória, introduziu-se uma segunda etapa para a separação.

Como se pode ver na Tabela 7.2, com duas etapas de separação, a recuperação da proteína total foi de 60 % para o sobrenadante da fermentação produzida

pela estirpe CCT 3172 com 10 $g.L^{-1}$ de glucose, muito próximo da percentagem inicial de enzima (cerca de 50 %) no sobrenadante original.

No caso do sobrenadante da fermentação produzido pela estirpe CH0-1 em sacarose, as duas etapas da separação conduziram a uma recuperação de proteína de 80 %, próximo também da percentagem no sobrenadante inicial. Estes resultados evidenciam a utilidade dos sistemas Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ para separação e purificação de enzimas extracelulares, produzidas por fermentação de leveduras.

Os ensaios realizados à escala laboratorial permitem também seleccionar qual o melhor sistema para a recuperação da enzima. Uma vez que a separação da enzima não é significativamente afectada pela composição das fases e temperatura do sistema, a selecção do melhor sistema baseou-se na simplicidade de operação e nos aspectos económicos. De notar no seguinte:

- a fermentação é usualmente realizada a 30 ºC;
- quanto mais alta for a temperatura, menor é a concentração de sal necessária para obter o SDFA, e maior a assimetria do diagrama de fases o que vai conduzir a maiores dificuldades no processo de extracção;
- a fase rica em enzima é a fase superior quando se opera a 30 ºC ou 40 ºC, facilitando a separação da endo-PG de algumas impurezas sólidas, que geralmente precipitam no fundo do separador;
- o SDFA a 30 ºC, com um comprimento de ligação de 28 % e uma razão de volume de fases entre 5 e 7, pode ser seleccionado como o melhor.

Recuperação do polímero

O polímero Ucon-HB-5100, na água, é um polímero termossensível. Acima dos 47 ºC, uma solução aquosa de 10 % a 40 % de polímero pode formar duas fases, ficando o Ucon concentrado na fase inferior.

Os ensaios de extracção mostram que a fase rica em polímero de um sistema Ucon-sal possui uma concentração de aproximadamente 25 % até 35 % de Ucon e inferior a 2,5 % de sal. Elevando a temperatura até 80 ºC, da fase rica em Ucon, é formado um novo sistema de duas fases aquosas. Este novo sistema possui a fase rica em polímero com uma concentração de 83 % até 87 % e uma concentração de sal inferior a 0,2 %.

Verifica-se também que pequenas quantidades de impurezas (álcool, sal, enzima e outras proteínas) presentes inicialmente no sobrenadante da fermentação e posteriormente na fase rica em Ucon tem uma pequena influência na concentração final da fase rica em Ucon recuperado após a termosseparação.

As experiências mostram que estas impurezas causam um desvio máximo de 1 a 2 % na concentração do Ucon recuperado, quando comparado com a recuperação da fase rica em Ucon livre de impurezas.

Esquema de separação para a recuperação da enzima

Os ensaios realizados à escala laboratorial, com duas etapas, mostraram a eficiência de separação da enzima endo-PG.

Baseado nestes resultados foi elaborado um esquema de separação para a recuperação da enzima, como apresentado na Figura 7.3.

O esquema consiste em três passos principais. Os dois primeiros consistem na extracção da enzima usando o SDFA (em duas etapas) e concomitantemente, a recuperação do polímero. O terceiro passo consiste na afinação da solução de enzima, removendo o polímero restante e o sal.

No primeiro passo, o sobrenadante da fermentação é concentrado cerca de 5 vezes e parcialmente purificado usando um SDFA constituído por 27 % Ucon-2,2 % $(NH_4)_2SO_4$, com uma razão de volume de fases de 6. A temperatura de operação foi de 30 ºC.

Após a separação, a fase superior (sal) rica em enzima foi bombeada para o segundo passo do esquema (segunda etapa da separação), enquanto a fase rica em polímero foi aquecida e 80 ºC para se proceder à termosseparação do polímero. Este polímero recuperado é então reutilizado nesta segunda etapa. É necessário adicionar cerca de 5 % do polímero total para compensar algumas perdas.

O segundo passo é muito semelhante ao primeiro, mas o volume a tratar é significativamente menor devido à concentração ocorrida no primeiro passo. Para se atingir a composição pretendida são adicionados: polímero (cerca de 5 % fresco e o restante recuperado) e água destilada, não sendo necessário adicionar sal.

A fase superior rica em enzima do primeiro passo é então concentrada cerca de 2,5 vezes neste segundo passo e purificada mais uma vez na fase rica em sal. A fase rica em polímero volta a ser aquecida para recuperação do mesmo.

O terceiro passo é um passo de afinação. A fase superior do segundo passo é misturada com uma pequena quantidade de polímero e aquecida a 40 ºC, para potenciar a separação das fases. Após centrifugação, a fase superior rica em enzima, que possui uma concentração em polímero muito baixa (cerca de 0,5 %) foi recolhida e dialisada para remover o sal. Desta forma a solução de enzima concentrada e purificada pode ser utilizada na indústria alimentar.

Nos dois primeiros passos, o tempo requerido para a extracção da enzima é cerca de meia hora para cada passo. No terceiro passo somente são necessários 10 minutos. Isto mostra que o tempo necessário para a concentração e purificação da enzima endo-PG demora cerca de 1,5 horas.

De forma a avaliar a adequabilidade do sistema, foi realizada uma experiência. O volume de sobrenadante de fermentação (528 mL), assim como a composição das fases em cada etapa e as outras condições de operação são apresentados na Figura 7.3.

O sobrenadante usado obteve-se da fermentação da estirpe *K. marxianus* CH0-1 usando como fonte de carbono a sacarose com 75 $g.L^{-1}$. A concentração inicial

da enzima no sobrenadante era de 11 $U.mL^{-1}$ e a concentração de proteína de 62,4 $mg.L^{-1}$. Após as duas etapas de extracção foi obtido 38 mL da solução salina rica em enzima, possuindo uma actividade enzimática de 147,4 $U.mL^{-1}$ e uma concentração de proteína de 692 $mg.L^{-1}$.

Neste ensaio, realizado à escala laboratorial, obteve-se na solução final rica em enzima uma actividade de 147,4 $U.mL^{-1}$. Este valor de actividade é cerca de 80 % superior à encontrada na solução comercial de enzima.

No terceiro passo não se verificaram perdas na actividade enzimática nem na concentração de proteína. Assim, após todo o processo a enzima foi concentrada 13,4 vezes, mantendo cerca de 96 % da actividade enzimática inicial.

Mais uma vez, verifica-se que o sistema Ucon-$(NH_4)_2SO_4$ é atractivo devido às pequenas quantidades de Ucon (13,1 g) e sal (17,6 g) consumidas durante o processo de extracção.

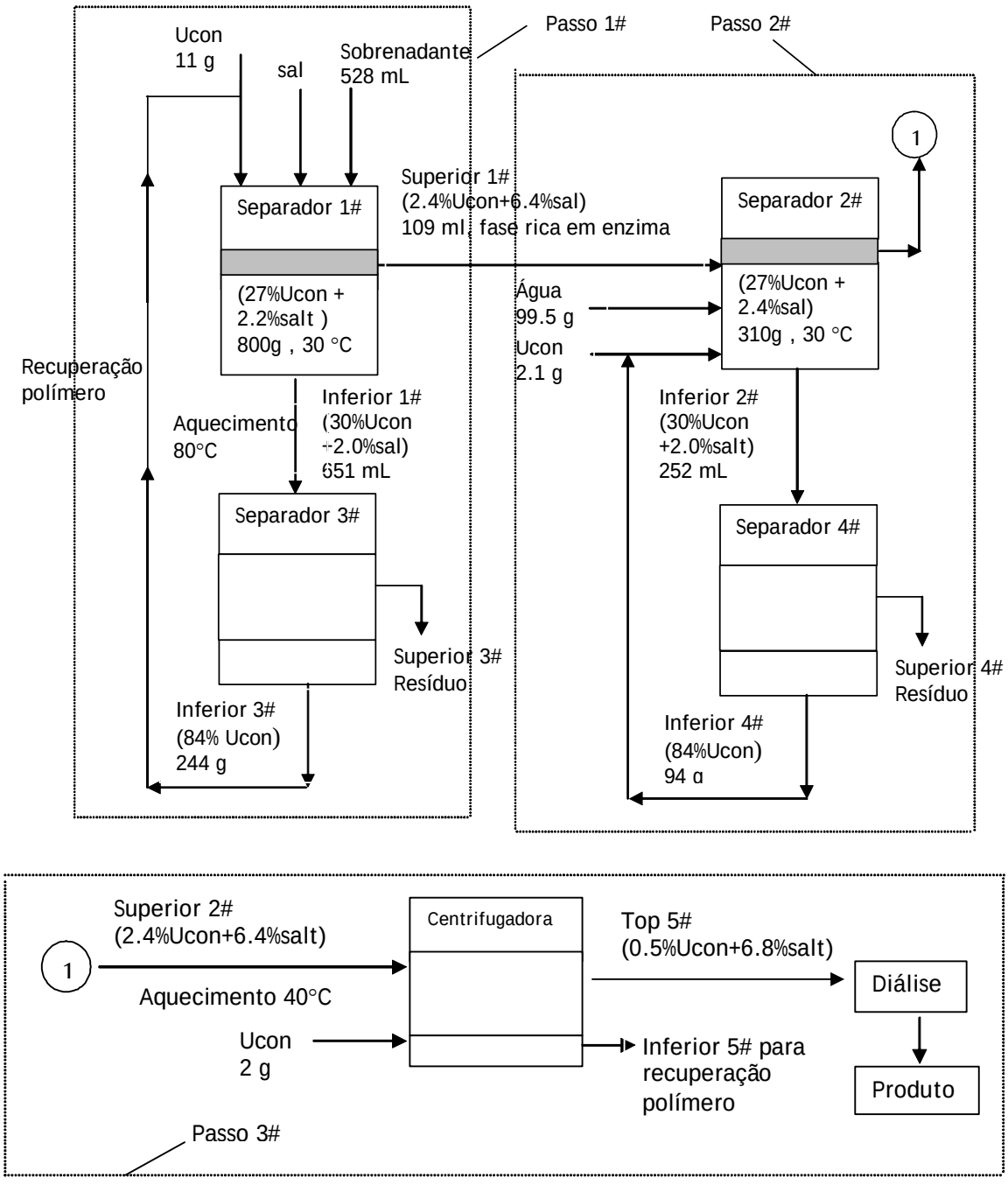


Figura 7.3 Representação esquemática do processo de extracção de endo-PG. Os valores entre parêntesis são a composição das fases e outras quantidades (líquidos ou sólido).

7.4 CONCLUSÕES

Na extracção da endo-PG, produzida pela fermentação de estirpes de *K. marxianus*, foi utilizado um polímero termossensível, Ucon 50-HB-5100, conjuntamente com PVA10000, Reppal PES100 e $(NH_4)_2SO_4$ para formar os SDFA. Verifcou-se que somente o último sistema apresentava características para poder ser utilizado, uma vez que o coeficiente de partição da enzima rondava o valor 0,004 e o da proteína os 0,07, indicando que a partição da enzima faz-se na fase rica em sal de uma forma mais acentuada que a da restante proteína.

Posteriormente os resultados obtidos dos vários ensaios de extracção com o SDFA Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, com sobrenadantes provenientes da fermentação de 3 estirpes, com diferentes substratos e concentrações, mostram que a eficiência do processo é pouco influenciada pelo tipo de sobrenadante da fermentação, concentração inicial de enzima, temperatura de operação (apesar da inversão de fases a 30 e 40 ºC, quando comparada com 22 ºC) e também pouco influenciada pela utilização de copolímero recuperado. A recuperação da actividade enzimática foi sempre superior a 95 %, chegando a atingir os 99,5 %.

O esquema proposto para a purificação da endo-PG, que consiste em três etapas de extracção em série, servindo as duas primeiras etapas para a extracção de enzima e em paralelo a recuperação do polímero; e a terceira etapa tendo como objectivo a remoção de polímero e restante sal, permitiu obter um factor de concentração de 10, mantendo mais de 95 % da actividade inicial, independentemente da proveniência do polímero (fresco ou recuperado).

Foi verificado que com este esquema é conseguida uma actividade enzimática na solução final superior à da solução comercial.

7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertsson, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules, 3rd ed, Wiley, New York. 1986.

Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding",. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254. 1976.

Cunha, M.T., Tjerneld, F., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R. Effect of electrolytes and surfactants on the thermoseparating of an ethylene oxide-propylene oxide random copolymer in aqueous solution. *Journal of Chromatography B*. 711, 53-60. 1998.

Fisher, D. e Sutherland, I. A. Separations using aqueous phase systems: applications in cell biology and biotechnology, Plenum, New York. 1989.

Harris, P. A., Karlström G., e Tjerneld, F. Enzyme purification using temperature-induced phase formation. *Bioseparation*. 2, 237-246. 1991.

Johansson, H.-O, Karlström, G. e Tjerneld, F. Experimental and theoretical study of phase separation in aqueous solutions of clouding polymers and carboxylic acids. *Macromolecules*. 26, 4478-83. 1993.

Persson, J., Nyström, L., Ageland, H. e Tjerneld, F. Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature induced phase separation. Biotechnology and Bioengineering. 65 (4) 371-381. 1999.

Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M. e Kaneko, M. Upper and lower critical solution temperatures in poly(ethylene glycol) solution. *Polymer*. 17, 685-689. 1976.

Walter, H. e Johansson, G. (eds) Methods in enzimology, vol 228. Aqueous two-phase systems. London, Academic Press. Pág 28-42. 1994.

Zhu, J. H., Wei, D. Z. e Cao, X. J. Effects of hydrophobicity of ethylene oxide-propylene oxide copolymers on phase diagrams of aqueous two-phase systems and partition behaviors of cephalexin and 7-aminodeacetoxicephalos-poranic acid. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 10, 240-243. 2002.



Capítulo 8

Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

175	8	Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro
177	8.1	Principais Conclusões
181	8.2	Trabalho Futuro

O trabalho presente nesta dissertação teve duas fases. A primeira consistiu em estudar e seleccionar estirpes de *Kluyveromyces marxianus*, isoladas da fermentação do cacau, que melhor produziam a enzima endo-PG. De seguida fez-se a caracterização de alguns SDFA que foram utilizados, posteriormente, para o estudo da partição da enzima e também para a extracção da enzima. Neste capítulo são introduzidas as principais conclusões do trabalho realizado e ainda as perspectivas de trabalho futuro.

8.1 PRINCIPAIS CONCLUSÕES

O trabalho presente nesta dissertação faz parte do projecto "Developing Latin American fruits using the yeast *Kluyveromyces marxianus* and its secreted pectinolitic enzyme, endopolygalacturonase (endo-PG)". Os objectivos deste projecto são:

- Produção de estirpes super produtoras de *Kluyveromyces marxianus*, através de modificação genética
- Estudar e optimizar a fermentação do cacau
- Produzir a enzima endo-PG
- Estudar e optimizar o processamento de frutos selvagens da América Latina

O trabalho realizado centrou-se no terceiro objectivo do projecto, que consistiu essencialmente na purificação da enzima endo-poligalacturonase por sistemas de duas fases aquosas, sendo previamente feita uma selecção das estirpes produtoras da enzima e uma caracterização da mesma. Para uma visão mais esclarecedora do trabalho realizado apresentam-se, de seguida, as principais conclusões.

Assim, de entre as estirpes de *K. marxianus* provenientes da fermentação do cacau, foram seleccionadas três para produzir a enzima endo-PG. O sobrenadante das fermentações será depois utilizado para optimizar o processo de separação através da utilização dos SDFA. As estirpes seleccionadas, por fermentação em meio contendo uma concentração de 10 $g.L^{-1}$ de fonte de carbono, foram:

- CH4-1 – melhor produtora (1,52 $U.mL^{-1}$) quando crescida em meios contendo como substrato a glucose;
- CH0-1 – melhor produtora (1,83 $U.mL^{-1}$) quando utilizada a sacarose como fonte de carbono;

- CCT 3172 – estirpe para a qual já existiam alguns trabalhos publicados, relativamente à produção de enzima. Os valores obtidos para a actividade enzimática foram 1,00 $U.mL^{-1}$ quando utilizada a glucose e 0,80 $U.mL^{-1}$ quando utilizada a sacarose como fonte de carbono.

Verificou-se também que produção de enzima está associado ao crescimento da levedura e que produtividade é máxima quando apenas é utilizada a agitação mecânica do meio de fermentação.

Utilizou-se a técnica da filtração em gel para determinar a massa molecular da enzima. Toda a actividade enzimática foi recolhida num só pico, que correspondiam às seguintes massas moleculares: 36, 33 e 29 para as estirpes CH4-1, CCT 3172 e CH0-1, respectivamente.

A técnica de filtração em gel e também de troca iónica permitiram avaliar o teor de enzima em relação à proteína total no sobrenadante da fermentação. Assim, verificou-se que para o sobrenadante proveniente da fermentação da estirpe CH0-1 cerca de 79 % da proteína total correspondia à endo-PG e, para as estirpes CH4-1 e CCT 3172, o teor de enzima correspondia a cerca de 54 e 52 %. Os valores encontrados permitiriam a obtenção de factores de purificação máximos de 1,3, 1,8 e 1,9 para as estirpes CH0-1, CH4-1 e CCT 3172, respectivamente. Para a estirpe CCT 3172 foi ainda usada a troca iónica para determinar o teor de enzima. Verificou-se, por este método, que cerca de 41 % da proteína total é a enzima endo-PG, correspondendo a um factor de purificação de 2,3.

Por último, realizou-se ensaios para avaliar a estabilidade da enzima a várias temperaturas e verificou-se que esta se mantém estável, durante cerca de uma semana, à temperatura ambiente.

Quanto ao trabalho de purificação por SDFA são de considerar vários aspectos e conclusões.

Determinou-se alguns diagramas de fases, cujos dados, foram posteriormente necessários para os ensaios de partição e purificação. Os novos diagramas de

fases obtidos foram para os SDFA Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, Ucon-PVA10000, Ucon-Reppal PES100 e PEG-PVA10000.

Estudou-se a partição da endo-PG em vários SDFA: PEG-$(NH_4)_2SO_4$, PEG-fosfato de potássio (pH=7) (para cada um destes SDFA testou-se a influência da massa molecular do PEG – 4000, 8000 e 20000 Da), PEG8000-Reppal PES100, PEG-PVA10000 (neste caso testou-se as massas moleculares 8000 e 2000). Para além da massa molecular do PEG, estudou-se a influência de outros parâmetros como pH, comprimento da linha de ligação, razão do volume de fases e adição de ligandos.

Verificou-se que os SDFA que permitiam a melhor separação da enzima foram os SDFA PEG8000-$(NH_4)_2SO_4$ e PEG-PVA10000. No primeiro caso a enzima migra para a fase inferior rica em sal e no segundo migra para a fase superior rica em PEG. O sistema 24 % PEG-5,6 % $(NH_4)_2SO_4$ que corresponde a um comprimento de linha de ligação moderado, cerca de 28 %, e uma razão de volume de fases entre 8 e 11, foi seleccionado para se efectuar a extracção da enzima. Propôs-se um esquema de separação de duas etapas em série que consiste, na primeira etapa na extracção da enzima com um SDFA e na segunda etapa na recuperação do PEG por adição de sal de modo a formar outro SDFA. Posteriormente à primeira etapa (enzima recolhida na fase rica sal), foi efectuada uma diálise de modo a remover os sais. Com este esquema de separação obteve-se um factor de purificação na ordem de 1,67 (ensaios realizados com a estirpe CCT 3172). O factor de purificação após aplicação do SDFA era da ordem de 1,25, o que indica que a diálise também contribui, ainda, para a remoção de proteínas de baixo peso molecular (< 140000 Da). O factor de concentração variou entre 5 e 8. Atendendo ao teor de enzima no sobrenadante da fermentação para a estirpe CCT 3172 (factor de purificação máximo de 1,90) verificou-se que a utilização deste SDFA favorece mais a concentração que a purificação.

De modo a melhorar o factor de purificação propôs-se um segundo esquema de separação. Este esquema consistia em três etapas:

- Na primeira etapa foi utilizado um SDFA 6,9 % PEG8000-8,7 % PVA cuja razão de volume de fases é cerca de 2 e o comprimento da linha de ligação é cerca de 20 %. Nesta etapa, a enzima foi recolhida na fase superior rica em PEG, e o objectivo principal foi a purificação da enzima; os factores de purificação e concentração obtidos foram 1,60 e 0,88, respectivamente.

- Na segunda etapa, cujo objectivo foi a concentração da enzima, utilizou-se um SDFA 24 % PEG8000- 5,6 % $(NH_4)_2SO_4$ com uma razão de volume de fases entre 8 e 10 e um comprimento de linha de ligação de 28%. Com esta extracção, a enzima foi recolhida na fase inferior rica em sal, passando os factores de purificação e concentração para 1,87 e 5,2, respectivamente. A recuperação da enzima foi de 91 %.

- Foi realizada uma terceira etapa para reciclagem do PEG. Cerca de 90 % do PEG foi recuperado. Foi verificado que os factores de recuperação de enzima, purificação e concentração se mantinham independentemente da fonte de PEG utilizado (fresco ou reciclado) e também independentemente do número de recuperações do mesmo.

- Por último, foi introduzida uma diálise para remoção de sais e foi verificado que não houve perdas em termos de recuperação de enzima.

Este esquema de separação apresenta-se como mais vantajoso que o primeiro uma vez que a purificação é conseguida com um SDFA, que apresenta em relação à diálise a facilidade do aumento de escala.

Apesar de se conseguir fazer a recuperação do PEG nos dois esquemas de separação anteriores, esta recuperação é feita à custa de um consumo extra de sal. De modo a melhorar a etapa de recuperação do polímero, foi estudada a extracção da endo-PG utilizando polímeros termossensíveis. Os SDFA estudados foram Ucon-$(NH_4)_2SO_4$, Ucon-PVA10000 e Ucon-Reppal PES100. Foi estudada a influência da composição do sistema e comprimento da linha de ligação. Mais uma vez o SDFA seleccionado foi o composto por polímero e sal.

Neste SDFA, a enzima migra para a fase superior rica em sal. O esquema proposto consiste em três etapas. As duas primeiras têm como objectivo

purificar e concentrar a enzima, usando SDFA 27 % Ucon – 2,2 % sal e também recuperar o Ucon, através do aumento da temperatura para 80 ºC. A terceira etapa tem como objectivo recuperar os resíduos de Ucon presentes na fase superior da segunda etapa e recolher a solução de enzima livre de sais. A fase superior da segunda etapa é aquecida a 40 ºC, formando um novo SDFA, e a fase superior deste novo sistema rica em enzima sofre uma diálise. Este esquema de separação permitiu obter um factor de concentração de 10, recuperando mais de 95 % da actividade enzimática.

8.2 TRABALHO FUTURO

O trabalho apresentado nesta dissertação representa uma parte de um percurso em que foram feitas opções. Certamente, tendo feito outras opções outros resultados seriam encontrados e novas perspectivas apareceriam. A presente dissertação não representa um fim do trabalho, mas apenas uma parte do mesmo. Assim, de seguida, são feitas algumas sugestões para trabalho a desenvolver que visam não só complementar o trabalho realizado, como também indicar novas linhas de investigação.

No primeiro e segundo esquema de separação (apresentados no capítulo 6) a recuperação do PEG é conseguida através de um consumo extra de sal, que posteriormente é recolhido na fase inferior do SDFA. Seria conveniente proceder à cristalização do $(NH_4)_2SO_4$, de modo a recuperá-lo e baixar os custos do processo.

No esquema de extracção proposto no capítulo 7 (SDFA a 30 ºC), a fase rica em sal, fase para onde migra a enzima, é a superior. Seria pertinente avaliar se as células do meio de fermentação poderiam ser separadas na fase inferior rica em Ucon. Nesta situação, retirava-se uma etapa de centrifugação prévia à aplicação do SDFA.

Para todos os esquemas de extracção, fazer o aumento para escala industrial de modo a avaliar a eficiência e operacionalidade do esquemas de extracção propostos.

Relativamente à produção de enzima, e apesar de já ter sido tentado por outro grupo de trabalho, teria bastante interesse encontrar uma estirpe "super-produtora" da enzima endo-PG, de modo a atingir níveis de actividade significativamente superiores ao encontrado na preparação comercial.

Por último será também pertinente avaliar a utilização de resíduos industriais como meio de cultura para a produção da enzima. O soro de queijo, efluente obtido na produção do queijo, que por um lado possui um elevado valor nutricional, mas por outro é muito poluente para o meio ambiente, é um dos meios que poderá ser testado, assim como o melaço de cana, resíduo da refinação de açúcar. Deste modo, minimiza-se o impacto destes resíduos no meio ambiente, assim como se baixa significativamente o custo da produção de enzima.



Anexo

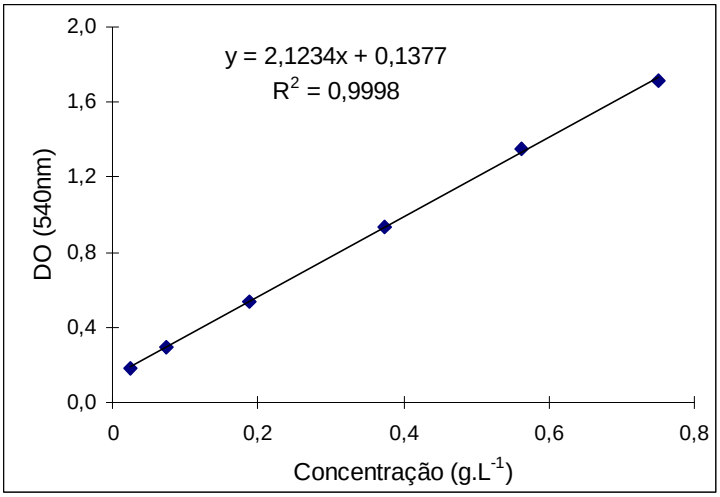
Calibrações

187	1	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ENDO-PG185
187	2	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BIOMASSA
188	3	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PROTEÍNA
190	4	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (DNS)
191	5	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SACAROSE (HPLC)
192	6	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA MASSA MOLECULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FILTRAÇÃO EM GEL
192	7	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRACÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO POLÍMERO

1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ENDO-PG

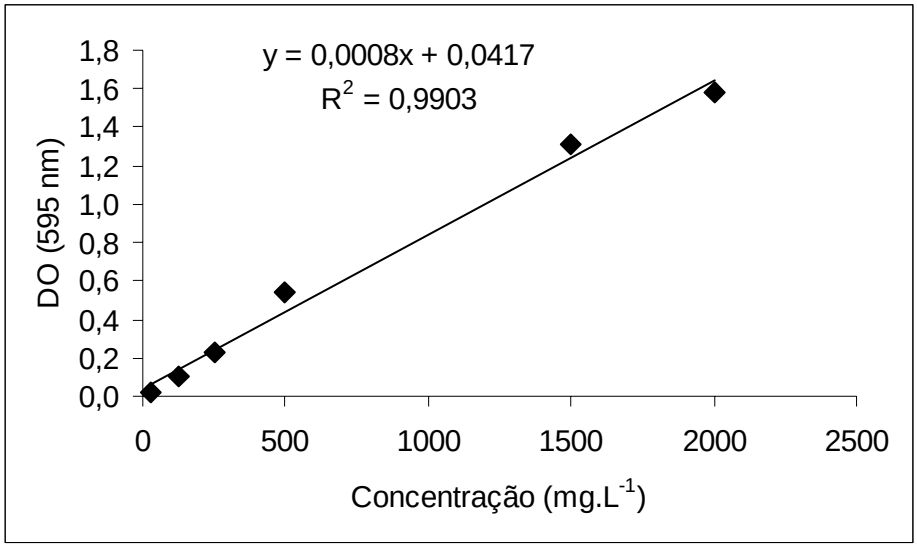
Método da cianoacetamida (Honda et al., 1982)

Concentração ($\mu mol.mL^{-1}$)	DO_1	DO_2	DO_3	DO_m
0,025	0,178	0,192	0,186	0,185
0,075	0,294	0,299	0,296	0,296
0,188	0,541	0,535	0,538	0,538
0,375	0,942	0,928	0,933	0,934
0,563	1,344	1,352	1,347	1,348
0,750	1,719	1,716	1,719	1,718



Método do DNS

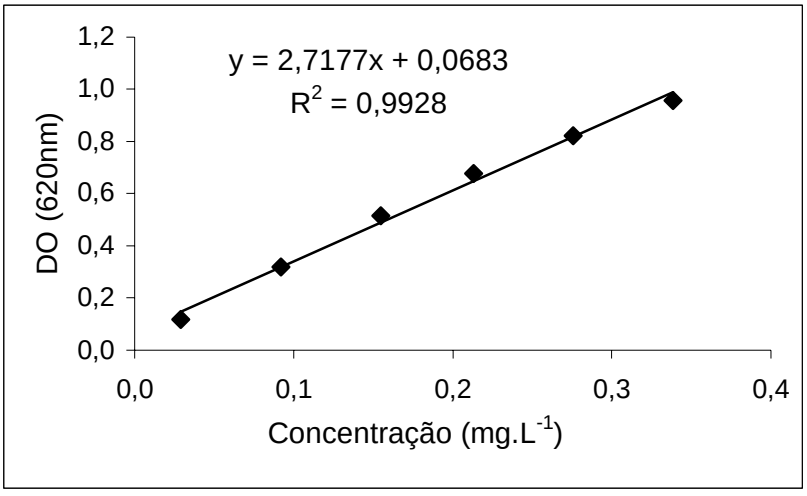
Concentração ($mg.L^{-1}$)	DO_1	DO_2	DO_m
25	0,012	0,024	0,018
125	0,091	0,119	0,105
250	0,221	0,240	0,231
500	0,543	0,538	0,541
1500	1,309	1,308	1,309
2000	1,454	1,709	1,582



2. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BIOMASSA

	m_{filtro} (g)	$m_{filtro+biomassa}$ (g)	$M_{biomassa}$ (g) (25 mL)
Filtro + água	0,2008	0,2008	0,0000
Filtro + água	**0**,2265	0,2265	0,0000
Filtro + cultura	**0**,1922	0,2419	0,0497
Filtro + cultura	**0**,2905	0,3387	0,0482
Filtro + cultura	**0**,2360	0,2856	0,0496
Filtro + cultura	**0**,2720	0,3192	0,0944
		Média	0,060475
		Concentração (g.L-1)	2,419

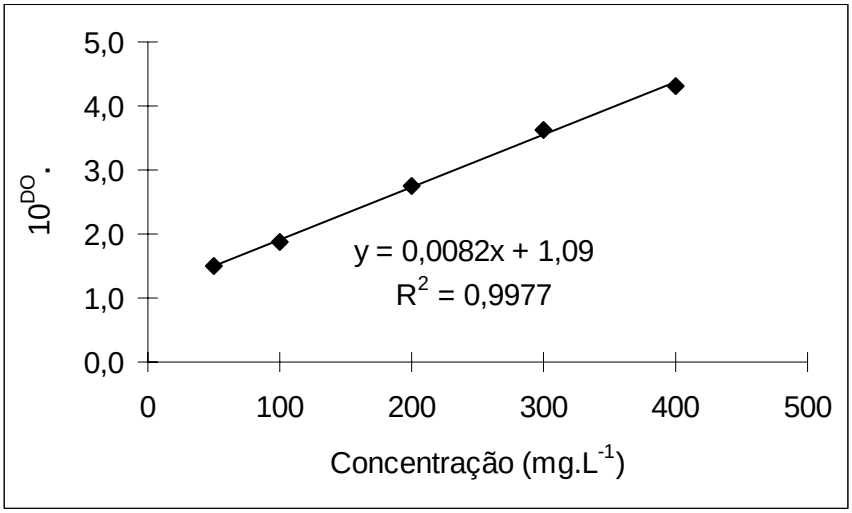
V (mL)	DO_1	DO_2	DO_m	Concentração ($g.L^{-1}$)
0,6	0,127	0,109	0,118	0,0290
1,9	0,316	0,320	0,318	0,0919
3,2	0,516	0,516	0,516	0,1548
4,4	0,676	0,679	0,678	0,2129
5,7	0,823	0,820	0,822	0,2758
7,0	0,950	0,963	0,957	0,3387
Volume final = 50 mL				



3. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PROTEÍNA

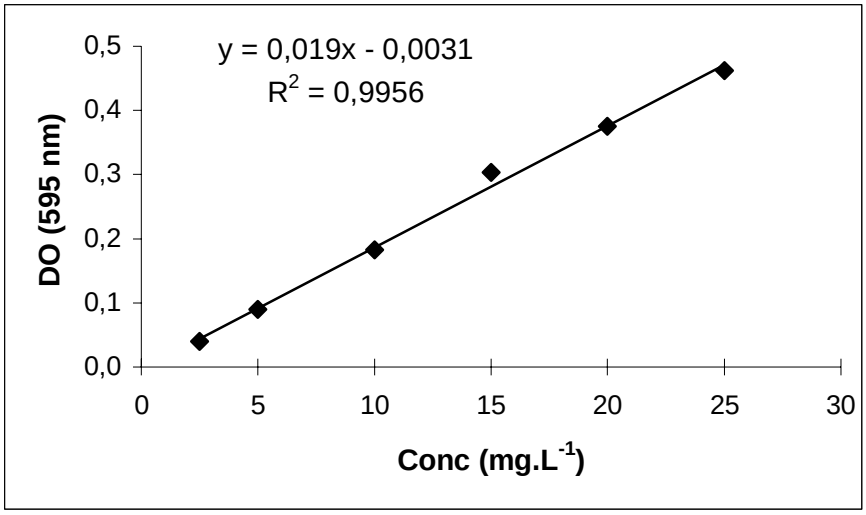
Método de Lowry (kit P 5656 Sigma)

Concentração ($mg.L^{-1}$)	DO_1	DO_2	DO_m	10^{DO}
50	0,365	0,436	0,401	1,493
100	0,616	0,645	0,631	1,879
200	0,996	1,023	1,010	2,744
300	1,276	1,304	1,290	3,633
400	1,451	1,468	1,460	4,304



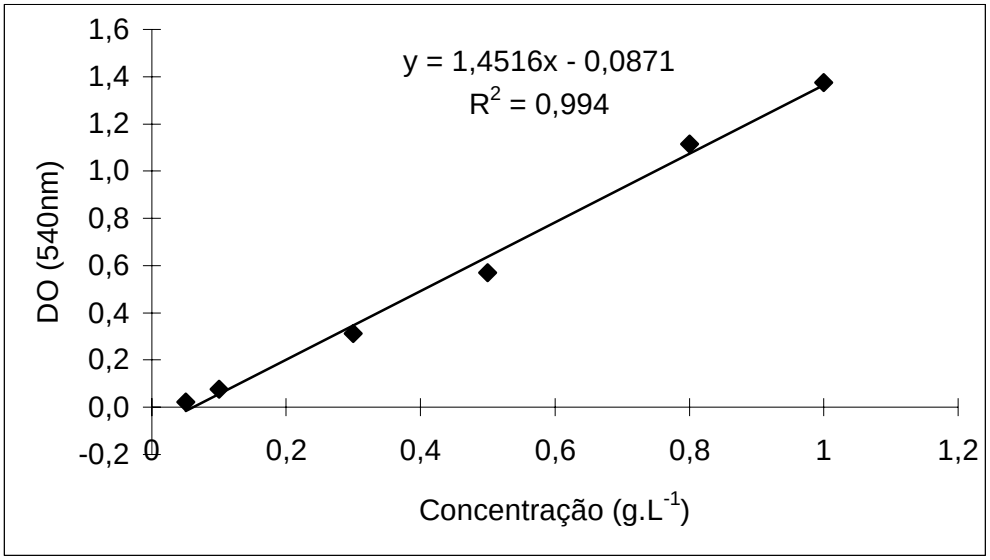
Método de Bradford (kit 23236, Pierce)

Concentração ($mg.L^{-1}$)	DO_1	DO_2	DO_3	DO_m
2,5	0,041	0,039	0,040	0,040
5,0	0,091	0,087	0,090	0,089
10,0	0,183	0,182	0,182	0,182
15,0	0,304	0,302	0,304	0,303
20,0	0,373	0,378	0,376	0,376
25,0	0,464	0,460	0,461	0,462



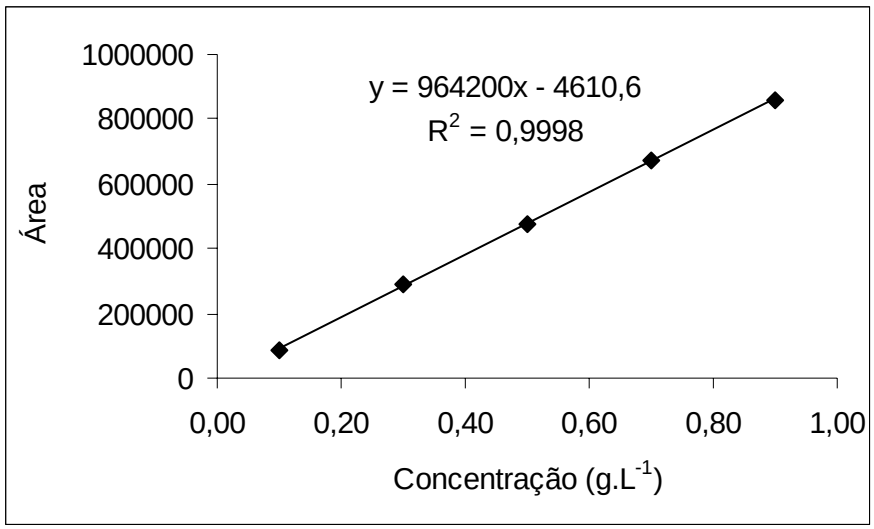
4. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (DNS)

Concentração ($g.L^{-1}$)	DO_1	DO_2	DO_3	DO_m
0,05	0,012	0,029	0,022	0,021
0,1	0,080	0,082	0,070	0,077
0,3	0,324	0,322	0,294	0,313
0,5	0,560	0,587	0,561	0,569
0,8	1,096	1,141	1,105	1,114
1	1,310	1,405	1,407	1,374



5. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SACAROSE (HPLC)

Concentração ($g.L^{-1}$)	$T_{retenção\ médio}$	$Área_{média}$
0,10	10,818	88764
0,30	10,805	288252
0,50	10,818	475865
0,70	10,818	674952
0,90	10,814	859614



6. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA MASSA MOLECULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FILTRAÇÃO EM GEL

A curva de calibração obtida foi

$$\text{Log } (M) = 2{,}10866 - 0{,}01448 \times (t - t_{lav})$$

Em que M – massa molecular, t_{lav} e t – tempo de lavagem da coluna e tempo de saída da proteína, respectivamente.

7. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRACÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO POLÍMERO

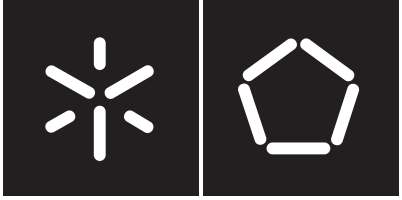
As equações seguintes são curvas de calibração obtidas para o índice de refracção a 25ºC,

$$I = 1{,}3325 + 0{,}0014173 \times C_{Ucon}$$

$$I = 1{,}3325 + 0{,}0015000 \times C_{PVA}$$

$$I = 1{,}3325 + 0{,}0013960 \times C_{PES}$$

em que C_{Ucon}, C_{PVA}, e C_{PES} são, respectivamente, as concentrações, em percentagem mássica, de Ucon, PVA e PES e I é o índice de refracção a 25 ºC.



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia Blológica
Escola de Engenharia
Universidade do Minho

2005