

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS  
MISSÕES URI ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MÁRCIA MARIA SANTIN TRENTINI**

**PURIFICAÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus  
niger* ATCC 9642 EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E  
PRECIPITAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS**

**ERECHIM**

**2014**

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS  
MISSÕES  
URI ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MÁRCIA MARIA SANTIN TRENTINI**

**PURIFICAÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus  
niger* ATCC 9642 EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E  
PRECIPITAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI).

Orientadores: Dra. Eunice Valduga  
Dr. Marco Di Luccio

**ERECHIM  
2014**

**Purificação de Pectinases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC  
9642 em sistemas aquosos bifásicos e precipitação por solventes  
orgânicos**

Márcia Maria Santin Trentini

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, como requisito ao Título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup> Eunice Valduga, D.Sc.  
Orientadora

---

Prof<sup>o</sup> Maurício de Moura da Silveira, D.Sc.  
UCS – Caxias do Sul

---

Prof<sup>a</sup> Luciane Maria Colla, D.Sc.  
UPF – Passo Fundo

---

Prof<sup>o</sup> Rogério Dallago, D.Sc.  
URI Erechim

---

Prof<sup>a</sup> Natália Paroul, D.Sc.  
URI Erechim

Julho de 2014

A meu filho Lucas e ao meu marido Elias  
pelo constante apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família por estarem sempre me incentivando.

A meu filho pelo constante apoio e incentivo.

Ao meu marido por estar ao meu lado, pela compreensão, carinho e cumplicidade.

Aos meus orientadores, Eunice e Marco, pelo suporte neste trabalho.

As colegas de doutorado pela amizade, conversas e risadas.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A URI pela estrutura física para elaboração desta tese.

A Deus por estar junto comigo.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Substâncias pécticas.....	3
2.1.1 Protopectina.....	4
2.1.2 Pectina.....	4
2.1.3 Ácido pectínico.....	5
2.1.4 Ácido péctico.....	5
2.2 Enzimas pectinolíticas ou pectinases.....	5
2.2.1 Poligalacturonases (PG).....	8
2.2.2 Pectinametilesterases (PME).....	9
2.2.3 Polimetilgalacturonato-liases ou pectina liases (PMGL).....	10
2.2.4 Poligalacturonato-liases ou pectato-liases (PGL).....	10
2.3 Produção de pectinases em fermentação submersa.....	11
2.4 Processos de recuperação de biomoléculas.....	12
2.4.1 Sistemas aquosos bifásicos.....	13
2.4.2 Precipitação com solventes orgânicos.....	19
2.5 Considerações Finais.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Preparo do inóculo do <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	23
3.2 Produção das enzimas pectinases (Exo-Poligalacturonase, Pectinametilesterase e Pectina liase).....	23
3.3 Purificação de pectinases por precipitação com solventes orgânicos.....	24

3.3.1 Precipitação com álcool etílico.....	24
3.3.2 Precipitação com acetona, álcool isopropílico e álcool n-propílico.....	25
3.3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da melhor condição da precipitação com álcool isopropílico.....	26
3.3.2.1.1 Preparo das amostras.....	26
3.3.2.1.2 Preparo do gel de resolução 15 %.....	26
3.3.2.1.3 Preparo do gel de empilhamento 12 %.....	27
3.3.2.1.4 Aplicação das amostras.....	27
3.4 Purificação de pectinases com sistemas aquoso bifásicos (SAB).....	28
3.4.1 “Screening” de diferentes condições do SAB – Sal/álcool.....	28
3.4.2 “Screening” de diferentes condições do SAB - PEG/Tampão fosfato de potássio.....	29
3.4.3 “Screening” de diferentes condições do SAB – PEG/Tampão citrato de sódio.....	30
3.5 Métodos Analíticos.....	31
3.5.1 Atividade da exo- poligalacturonase (exo-PG).....	31
3.5.2 Atividade da pectinametilesterase (PME).....	31
3.5.3 Atividade da pectina liase (PMGL ou PL).....	32
3.6 Determinação dos parâmetros de respostas.....	32
3.6.1 Fator de purificação.....	32
3.6.2 Recuperação da enzima.....	33
3.6.3 Razão volume.....	33
3.6.4 Coeficiente de partição.....	33
3.7 Tratamento estatístico.....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
4.1 Purificação de pectinases por precipitação com solventes orgânicos.....	35
4.1.1 Precipitação com álcool etílico.....	35
4.1.2 Precipitação com acetona, álcool isopropílico e álcool n-propílico.....	46
4.1.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da melhor condição da precipitação com álcool isopropílico.....	59
4.2 Purificação de pectinases com sistemas aquosos bifásicos (SAB).....	61
4.2.1 “Screening” de diferentes condições do SAB - Álcool/Sal.....	61
4.2.2 “Screening” de diferentes condições do SAB – PEG/Tampão fosfato de potássio.....	66

4.2.3 “Screening” de diferentes condições do SAB – PEG/Tampão citrato de sódio.....	74
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>80</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>100</b>

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

**PURIFICAÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* ATCC 9642 EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E PRECIPITAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS**

Márcia Maria Santin Trentini

Julho/2014

Orientadores: Dra. Eunice Valduga

Dr. Marco Di Luccio

O presente trabalho visa o estudo de diferentes estratégias para a purificação de pectinases (exo-poligalacturonase - exo-PG, pectinametilesterase - PME, pectina liase - PMGL) produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642. Foram testados métodos de concentração e purificação da enzima, baseados nas técnicas de precipitação com sais, solventes e sistemas aquosos bifásico. Os sistemas aquosos foram compostos por polietilenoglicol e fosfato de potássio, polietilenoglicol e citrato de sódio e misturas de sais (sulfato de amônio, fosfato de potássio e citrato de sódio) e álcoois (etanol, n-propílico e isopropílico). As condições de precipitação e de purificação por sistema aquoso bifásico foram otimizadas para se obter o maior fator de purificação e recuperação possíveis das enzimas. A utilização de álcool etílico (50 % e vazão de 10 mL/min) possibilitou a obtenção de fator de purificação de 1,3 vezes e recuperação de 51,3 % para exo-PG na fase sobrenadante; de 2,25 e 77,8 % para a PME (78 % e 17 mL/min) e 4,76 vezes e 578,6 % para a PMGL (50 % e 10 mL/min), ambas na fase precipitada. Na precipitação com álcool isopropílico (90 % e vazão de alimentação de 10 mL/min), os maiores fatores de purificação e recuperação da PME foram na fase precipitada, de 7,86 vezes e 77,78 %, para as enzimas exo-PG e PMGL foram na fase sobrenadante, com 1,12 e 50,4 % para a exo-PG em concentração de 50 % álcool e 10 mL/min, e 4,12 e 246,1 % para a PMGL em 50 % e vazão de 17 mL/min. Os sistemas aquosos bifásicos apresentaram-se como um método eficiente de purificar pectinases com uma máxima purificação da exo-PG, PME e PMGL (ambos na fase de topo) de

2,38, 7,85 e 5,66 vezes e recuperação de 100, 331 e 239 %, Razão volume de 16, empregando 40 % de PEG 6000 e 5 % de tampão citrato de sódio, respectivamente.

**Palavras- chave:** Pectinases, purificação, *Aspergillus niger*, sistema aquoso bifásico, precipitação, solventes orgânicos.

Abstract of Thesis presented to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor of Food Engineering.

**PURIFICATION OF PECTINASES PRODUCED FOR *Aspergillus niger* ATCC  
9642 AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS AND PRECIPITATION IN  
ORGANIC SOLVENTS**

Márcia Maria Santin Trentini

July/2014

Leader: Dra. Eunice Valduga

Dr. Marco Di Luccio

The present work aims to study different strategies for the purification of pectinase (exo-polygalacturonase - exo-PG, pectinmethylesterase - PME, pectin lyase - PMGL) produced by *Aspergillus niger* ATCC 9642. Methods of concentration and purification of the enzyme were tested based on the techniques of precipitation with salts, solvents, and aqueous two-phase systems (ATPS). The ATPS were composed of polyethylene glycol and potassium phosphate, polyethylene glycol and sodium citrate and mixtures of salts (ammonium sulfate, potassium phosphate and sodium citrate) and alcohols (ethanol, n-propyl and isopropyl). The conditions of precipitation and purification by ATPS were optimized to obtain the highest purification factor and recovery of enzymes possible. The use of ethanol (50 %, flow rate 10 mL/min) allowed obtaining purification factor value of 1.3 fold and 51.3 % for exo-PG in the supernatant phase; 2.25 to 77.8 % for PME (78 % and 17 ml/min) and 4.76 fold and 578.6 % for PMGL (50 % and 10 ml/min) both the precipitated phase. Precipitation with isopropyl alcohol (90 % and feed flow rate of 10 mL/min), the largest purification factor and recovery of the PME were precipitated phase, 7.86 fold and 77.78 %, for the exo-PG and PMGL enzymes were in the supernatant phase 1.12 and 50.45 % for the exo-PG at a concentration of 50 % alcohol and 10 ml/min and 4.12 and 246.1 % for the PMGL to 50 % and a flow rate of 17 mL / min. The aqueous two-phase systems was presented as an efficient method of purifying pectinases of the maximum purification of exo-PG and PME (both top phase)

were 2.38, 7.85 and 5.66 fold, and R 100, 331 and 239 %, volume ratio of 16, employing 40 % PEG 6000 and 5 % sodium citrate buffer, respectively.

**Keywords:** Pectinases, purification, *Aspergillus niger*, aqueous two-phase systems, precipitation, organic solvents.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura das pectinas (FOGARTY & KELLY, 1983).....	4
FIGURA 2 - Modo de ação das pectinases: PG - poligalacturonase; PMGL - pectina liase; PMG - Polimetilgalacturonase; PE/PME - pectinametilsterase; PGL – pectato liase (SAKAI, 1992) .....	8
FIGURA 3: Diagrama de fases, expresso em coordenadas retangulares, de um SAB formado por um polímero e um sal (DA SILVA <i>et al.</i> , 2006).....	16
FIGURA 4: Fluxograma da produção das pectinases em fermentação submersa.....	24
FIGURA 5: Fluxograma da precipitação com solventes orgânicos (álcool etílico e isopropílico).....	25
FIGURA 6: Fluxograma da purificação com SAB sal/álcool.....	28
FIGURA 7: Fluxograma da purificação com SAB PEG/fosfato.....	29
FIGURA 8: Fluxograma da purificação com SAB PEG/citrato.....	30
FIGURA 4: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ do precipitado, em relação ao FP da enzima PME, respectivamente.....	37
FIGURA 5: Curva de contorno para a R da PME da fase precipitada em função da concentração de álcool etílico e vazão de alimentação.....	38
FIGURA 6: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ , em relação ao FP do precipitado da enzima PMGL.....	39
FIGURA 7: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ , em relação a R do precipitado da enzima PMGL.....	40
FIGURA 8: Curva de contorno para a R da exo-PG da fase sobrenadante em função da concentração de álcool etílico e vazão de alimentação.....	42
FIGURA 9: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ , em relação R da enzima PME do sobrenadante.....	43
FIGURA 10: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ do sobrenadante, em relação ao FP da enzima PMGL, respectivamente.....	44

FIGURA 11: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ , em relação a R da enzima PMGL do sobrenadante..	45
FIGURA 12: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ purificação com álcool isopropílico em relação ao FP da enzima exo-PG da fase precipitada.....	49
FIGURA 13: Curva de contorno para a R da exo-PG da fase precipitada em função da concentração de álcool isopropílico e vazão de alimentação.....	50
FIGURA 14: Curva de contorno para o FP da enzima PME fase precipitada álcool isopropílico.....	51
FIGURA 15: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ da fase precipitada álcool isopropílico em relação ao FP da enzima PMGL, respectivamente.....	52
FIGURA 16: Curva de contorno para o FP da enzima exo-PG fase sobrenadante álcool isopropílico.....	54
FIGURA 17: Curva de contorno para a R da exo-PG da fase sobrenadante em função da concentração de álcool isopropílico e vazão de alimentação.....	55
FIGURA 18: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ com álcool isopropílico em relação ao FP da enzima PME da fase sobrenadante.....	56
FIGURA 19: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ com álcool isopropílico em relação a R da enzima PME da fase sobrenadante.....	56
FIGURA 20: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo $2^2$ com álcool isopropílico em relação ao FP da enzima PMGL da fase sobrenadante.....	57
FIGURA 21: Curva de contorno para a R da PMGL da fase sobrenadante em função da concentração de álcool isopropílico e vazão de alimentação.....	58
FIGURA 22: SDS–PAGE das diferentes frações do extrato enzimático. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molar (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 and 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto ( <i>Aspergillus niger</i> ). Linha 3: extrato enzimático após precipitação com álcool isopropílico 50 %/10 mL/min.....	60
FIGURA 23: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do	

planejamento fatorial $2^2$ empregando SAB álcool isopropílico e citrato de sódio em relação ao FP da enzima exo-PG – fase de fundo.....	65
FIGURA 24: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial $2^2$ empregando SAB álcool isopropílico e citrato de sódio em relação a R da enzima PMGL – fase de topo.....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ , valores codificados (reais) da precipitação com álcool etílico e respostas em fator de purificação e recuperação da fase precipitada.....	36
TABELA 2: Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ , valores codificados (reais) da precipitação com álcool etílico e respostas em fator de purificação e recuperação das pectinases da fase sobrenadante.....	41
TABELA 3: Fator de purificação e recuperação da exo-PG obtidos na fase precipitada após a precipitação com solventes.....	46
TABELA 4: Fator de purificação e recuperação de exo-PG obtidos na fase sobrenadante após a precipitação com solventes.....	47
TABELA 5: Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ , valores codificados (reais) da precipitação com álcool isopropílico fase precipitada e respostas em fator de purificação e recuperação.....	48
TABELA 6: Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ , valores codificados (reais) da precipitação com álcool isopropílico fase sobrenadante e respostas em fator de purificação e recuperação.....	53
TABELA 7: Tratamento do extrato enzimático precipitado com álcool isopropílico fase precipitada e sobrenadante das enzimas exo-PG, PME e PMGL.....	59
TABELA 8: Fator de purificação e recuperação da exo-PG empregando sistema aquoso bifásico sal e álcool fase de topo.....	61
TABELA 9: Tratamento do extrato enzimático com SAB sal e álcool fase de topo e fundo enzima exo-PG, PME e PMGL.....	62
TABELA 10: Matriz do planejamento fatorial $2^2$ , valores codificados (reais) para a purificação com sistema aquoso bifásico sal (Citrato de Sódio) e álcool isopropílico (fase de topo) e respostas em termos de FP e R das pectinases (exo-PG, PME e PMGL).....	63
TABELA 11: Matriz do planejamento fatorial $2^2$ , valores codificados (reais) para a purificação com sistema aquoso bifásico sal (Citrato de Sódio) e álcool isopropílico (fase de fundo) e respostas em termos de FP e R das pectinases (exo-PG, PME e PMGL).....	64
TABELA 12: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão fosfato de potássio pH 6,0. Dados correspondentes à fase de topo.....	67

TABELA 13: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão fosfato de potássio pH 6,0. Dados correspondentes à fase de fundo.....	69
TABELA 14: Fator de purificação e recuperação da enzima exo-PG, PME e PMGL (Fase de topo e fundo) empregando SAB PEG e tampão fosfato de potássio pH 6,0.....	70
TABELA 15: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão fosfato de potássio pH 7,0. Dados correspondentes a fase de topo.....	71
TABELA 16: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão citrato de sódio pH 5,0. Dados correspondentes a fase de topo.....	75
TABELA 17: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão citrato de sódio pH 5,0. Dados correspondentes a fase de fundo.....	76
TABELA 18: Fator de purificação e recuperação da enzima exo-PG, PME, PMGL (Fase de topo e fundo) empregando SAB PEG e tampão citrato de sódio pH 5,0.....	77

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CCRD = Planejamento central composto rotacional

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNS = Ácido 3,5 dinitrosalicílico

endo-PG = endo-poligalacturonase

exo-PG = exo-poligalacturonase

FP = Fator de purificação

kDa = Quilo Dalton

$K_m$  = Constante de Michaelis-Menten

$K_e$  = Coeficiente de partição

PG = Poligalacturonase

PE = Enzima pectinase

PEG = Polietilenoglicol

PGL = Pectato liase

PME = Pectinametilesterase

PMGL = Pectina liase

R = Recuperação

SAB = Sistema Aquoso Bifásico

$V_m$  = Velocidade máxima da reação

## **1. INTRODUÇÃO**

As pectinases são biotecnologicamente importantes porque têm aplicações em potencial no processamento de frutas e legumes, como na clarificação de sucos de frutas, na maceração das fibras naturais, no tratamento de águas residuais pecticas, na fermentação de café e folhas de chá, na extração de óleo, purificação de vírus, etc (YADAV *et al.*, 2008; KHAN, *et al.*, 2013). Estudos de purificação e caracterização de enzimas produzidas por fungos filamentosos e bactérias têm sido relatados na literatura, porém raras são as informações que evidenciam a purificação de pectinases. A maioria dos estudos relatam a purificação por processos cromatográficos (DEMIRDAĞ *et al.*, 2013; CELESTINO *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2008), com o objetivo final de obter uma enzima com grau de pureza bastante elevado, visando apenas a sua completa caracterização, sem a preocupação com custos e a relação do grau de pureza com a aplicação pretendida.

Estudos sobre estratégias de purificação que utilizem processos simples e de baixo custo, mas que possibilitem alcançar altos fatores de purificação e recuperação da enzima, são importantes do ponto de vista industrial (OOI *et al.*, 2009; AMID *et al.*, 2013, MACIEL *et al.*, 2014). O aumento do grau de pureza das preparações enzimáticas, sem aumentar o custo final da enzima, pode contribuir para ampliar as aplicações industriais destas enzimas, melhorando a qualidade final de diversos produtos que podem se beneficiar da tecnologia enzimática. Além disso, preparados enzimáticos mais puros e concentrados implicam em maior rendimento na sua aplicação, pois concentrações menores podem ser utilizadas.

Em relação às técnicas que podem ser aplicadas na purificação de enzimas, de modo a maximizar a pureza sem acarretar maiores prejuízos no rendimento, destacam-se o sistema aquoso bifásico (SAB) e a precipitação com solventes orgânicos. Os sistemas aquosos bifásicos são formados pela adição de dois polímeros solúveis em água ou um polímero solúvel em água e um componente de baixa massa molar, como sais inorgânicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Para a purificação, o produto alvo deve estar localizado em uma fase distinta dos contaminantes. A partição do material biológico ocorre quando dois polímeros ou um polímero e um sal, são misturados em água acima de certas concentrações, ocorrendo a formação de duas fases imiscíveis, uma rica em polímero e a outra enriquecida no outro polímero ou sal (SHANG *et al.*, 2004). A precipitação com solventes orgânicos serve para conseguir a separação pela

conversão de solutos em sólidos, que podem ser posteriormente removidos por separação sólido/líquido. Isto deve-se ao fato que os solventes orgânicos aumentam a atração entre as moléculas de proteína e neste caso, agregados são formados até que as partículas atinjam proporções macroscópicas e precipitem (CORTEZ & PESSOA, 1999; YOSHIKAWA *et al.*, 2012).

Neste contexto, insere-se o objetivo do presente estudo, que visa a aplicação de diferentes estratégias de purificação de pectinases bioproduzidas pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 9642, empregando processos de precipitação e sistemas aquosos bifásicos. Como objetivos específicos podem-se delinear as seguintes metas do trabalho:

- Estudar diferentes métodos de concentração e pré-purificação das pectinases fúngicas utilizando precipitação com solventes (álcool etílico, álcool n-propílico, álcool isopropílico e acetona),
- Otimizar a purificação das enzimas com o método de precipitação mais adequado,
- Avaliar a purificação das pectinases utilizando diferentes sistemas aquosos bifásicos, compostos por sal (fosfato de potássio, citrato de sódio e sulfato de amônio) e álcool (etílico, n-propílico, isopropílico), polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio, PEG e citrato de sódio,
- Otimizar a purificação da enzima com o sistema aquoso bifásico mais relevante,

Esta tese está dividida conforme descrição resumida apresentada a seguir. No item 2, será apresentada uma breve revisão da literatura acerca dos temas envolvidos no presente estudo, relacionados às substâncias pécticas, às enzimas pectinases, à produção de pectinases em fermentação submersa e os processos de recuperação de biomoléculas por sistemas aquoso bifásico e precipitação com solventes orgânicos. No item 3, serão apresentados os métodos para a produção da enzima, os métodos de medida de atividade das enzimas exo-PG, PME e PMGL e os sistemas de purificação e precipitação. No item 4, serão apresentados e discutidos os resultados do estudo da precipitação por solventes orgânicos e o sistema aquoso bifásico. No item 5, serão apresentadas as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste item serão apresentadas informações sobre enzimas pectinolíticas ou pectinases, abordando principalmente os aspectos de purificação de enzimas pectinases por diferentes métodos.

### ***2.1 Substâncias pécticas***

As substâncias pécticas (às vezes chamadas de pectinas), descobertas no século XVIII (YAPO, 2011), são os mais abundantes carboidratos presentes nas paredes celulares de plantas superiores e as grandes responsáveis pela integridade dos tecidos vegetais, uma vez que a lamela média é a camada ligante existente entre as células destes, na forma de pectato de cálcio e pectato de magnésio. A degradação da pectina da lamela média resulta na desintegração do tecido através da separação das células (maceração). A pectólise, ou degradação da pectina, é um fenômeno importante, associado a muitos processos biológicos, tais como, crescimento de plantas, amadurecimento de frutas e perda de folhas (FORGARTY & KELLY, 1983; GUMMADI & PANDA, 2003; JAYANI *et al.*, 2005).

As substâncias pécticas são heteropolissacarídeos constituídos de uma cadeia principal formada por unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações  $\alpha$ , com pesos moleculares variando entre 25-360 kDa, com carga negativa, ácidos, macromoléculas glicosídicas complexas (polissacarídeos), que estão presentes no reino vegetal (JAYANI *et al.*, 2005). Essas substâncias são amplamente distribuídas em frutas e vegetais (10 a 30 % em nabos, cascas de laranja e em polpas de abacaxi, tomate e limão), portanto, formam importantes substratos naturais para pectinases (GUMMADI & PANDA, 2003).

Essas substâncias, depositadas na parede celular primária durante as primeiras etapas de crescimento do vegetal, representam de 0,5 a 4,0 % do peso fresco dos vegetais, são geralmente amorfas e possuem grau de polimerização de cerca de 200 a 400. Substituintes podem ser achados nos carbonos das posições C-2 ou C-3 da cadeia principal e podem ser qualquer glicosídeo (D-galactose, D-xilose, L-arabinose e L-ramnose) ou não glicosídeo (acetil). O grau e tipo de ramificação variam e dependem da fonte da substância péctica. A síntese dessas substâncias acontece geralmente no

Complexo de Golgi durante as fases iniciais do crescimento da célula (JAYANI *et al.*, 2005).

Como a maioria dos polissacarídeos, as substâncias pécnicas são heterogêneas com respeito à estrutura química, peso molecular, grau de esterificação e acetilação, bem como na distribuição e tipo de açúcares neutros ligados. Sua composição varia com a fonte, as condições de extração, a localização e outros fatores ambientais. Por isso, elas são classificadas em quatro tipos principais: protopectina, pectina, ácidos pécnicos e ácidos pectínicos (THAKUR *et al.*, 1997).

### 2.1.1 Protopectina

A protopectina quando sofre hidrólise restrita produz ácido pécnico ou pectínico. Protopectina ocasionalmente é um termo usado para descrever as substâncias pécnicas insolúveis em água encontradas em tecidos de plantas e a partir do qual substâncias solúveis pécnicas são produzidas (KASHYAP *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Pectina

A pectina (Figura 1) é o material polimérico em que, pelo menos, 75 % dos grupos carboxila das unidades galacturonato são esterificados com metanol (JAYANI *et al.*, 2005). Este termo designa ácidos pectinolíticos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster. Em uma fruta verde, a pectina é ligada a microfibras de celulosas na parede da célula. A molécula de pectina é um polímero de  $\alpha$ -(1,4) ligada a unidades de ácido D-galacturônico (GAINVORS *et al.*, 2000).

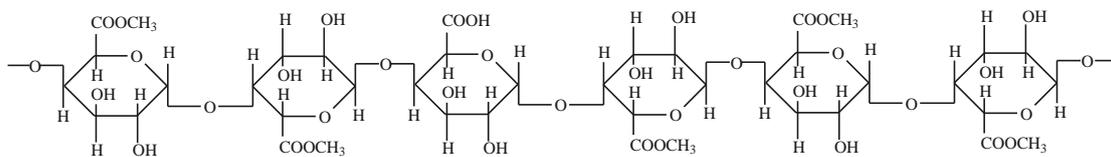


FIGURA 1: Estrutura das pectinas (FOGARTY & KELLY, 1983).

Na fruta verde, a pectina é insolúvel e conseqüentemente confere rigidez às paredes da célula. Porém, durante o amadurecimento a estrutura da pectina é alterada por enzimas naturalmente presentes nas frutas. Estas alterações envolvem o desarranjo da cadeia de pectina ou de correntes laterais presas às unidades que compõem a cadeia

principal. O resultado é que a molécula de pectina fica mais solúvel (THAKUR *et al.*, 1997).

### **2.1.3 Ácido pectínico**

O ácido pectínico é constituído de cadeias de poligalacturonas que contém entre 0 e 75 % de unidades de galacturonatos metilados. Sais ácidos ou neutros de ácido pectínico são referidos como pectinatos (JAYANI *et al.*, 2005).

### **2.1.4 Ácido péctico**

Os ácidos pécticos são polímeros solúveis de galacturonas que contém pequena quantidade de grupos metoxila. Sais ácidos ou neutros de ácido pécticos são chamados pectatos (JAYANI *et al.*, 2005).

## **2.2 Enzimas pectinolíticas ou pectinases**

As enzimas são biocatalisadores que aceleram a velocidade das reações químicas que acontecem nos animais ou vegetais. A velocidade de uma reação é medida pela quantidade de desaparecimento do substrato ou do aparecimento do produto em uma unidade de tempo. Quanto maior o número atuante de moléculas da enzima, maior será a velocidade da reação (RIEGEL, 2001). As características mais impressionantes das enzimas são o seu poder catalítico e a sua especificidade. A catálise ocorre em um local particular na enzima chamado de centro ativo (BERG *et al.*, 2008).

As enzimas podem ser obtidas através de extração de tecidos animais e vegetais ou produzidas por micro-organismos. As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas. A diversidade de micro-organismos existentes justifica a busca por novos produtores de enzimas (CARVALHO *et al.*, 2005; ROVEDA *et al.*, 2010; ALIMARDANI-THEUIL *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2013). A identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam

possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos a partir de enzimas vegetais ou animais (ROVEDA *et al.*, 2010 apud OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A utilização de enzimas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos. Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da última década que o verdadeiro potencial que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica começou a ser explorado. Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica (REETZ, 2002; GOMES *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2013).

Várias classes diferentes de enzimas, chamadas coletivamente pectinases, participam da quebra de pectina (CASTILHO *et al.*, 2000). As enzimas pectinases (PE) são uma preparação multi-componente enzimáticas que rompe as ligações glicosídicas com cadeia longa de resíduos de ácido galacturônico em substâncias pécnicas em células vegetais (BING *et al.*, 2010).

Pectinases, celulases e hemicelulases têm ampla aplicação nas indústrias de processamento de frutas, têxteis e de fabricação de papel, no tratamento de águas residuais pécnicas, na fermentação de café e chá, na extração de petróleo, etc (BING *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2013; YADAV *et al.*, 2008).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos, por algumas bactérias e por poucas leveduras. As pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas no processamento de sucos. Sua aplicação comercial foi primeiramente observada em 1930, para a preparação de vinhos e sucos de frutas (KASHYAP *et al.*, 2001).

As preparações enzimáticas utilizadas na indústria alimentícia são na maior parte de origem fúngica, pois os fungos são produtores potenciais de enzimas pécnicas e o pH ótimo das enzimas fúngicas é próximo do pH de muitos sucos de fruta, que variam entre 3,0 e 5,5 (KAR & RAY, 2011 apud ANGELOVA, 2008). Tais preparações não são muitas vezes adequadas para produção de suco de vegetais e purês ou outras preparações em que valores de pH são próximos do neutro (KAR & RAY, 2011 apud SOARES *et al.*, 1999). Devido à baixa estabilidade de temperatura das preparações enzimáticas fúngicas, a maceração deve ser realizada a temperatura não superior a 45°C e a utilização de uma etapa de pasteurização para limitar o crescimento de micro-organismos mesófilos é necessária (KASHYAP *et al.*, 2001).

Tem sido relatado que pectinases microbianas respondem por 25 % das vendas mundiais de enzimas de alimentos. Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas a partir de fontes de fungos. *Aspergillus niger* é a mais comum das espécies de fungos utilizadas para a produção industrial de enzimas pectinolíticas (JAYANI, *et al.*, 2005).

A classificação das diferentes pectinases é feita de acordo com o modo de ação de cada enzima sobre a molécula dos polímeros pécticos, pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo) ou terminal (exo) (UENOJO, 2003). Existem basicamente três grupos de pectinases: as protopectinases, as esterases e as despolimerases (JAYANI *et al.*, 2005; SIEIRO *et al.*, 2012).

As protopectinases são enzimas que hidrolisam a protopectina insolúvel gerando a pectina polimerizada solúvel. São classificadas em dois tipos: o tipo A que reage com a região de ácido poligalacturônico da protopectina e a do tipo B que reage com as cadeias de polissacarídeos que podem se conectar com as cadeias de ácido poligalacturônico e os constituintes das paredes celulares (UENOJO, 2003).

As esterases são também conhecidas como polimetilgalacturonato esterase (ALKORTA *et al.*, 1998), catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico ou ácido pectínico (SIEIRO *et al.*, 2012; KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI *et al.*, 2005).

As despolimerases catalisam a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre os monômeros do ácido D-galacturônico. Estas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise (hidrolases), catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminação (liases) (SIEIRO *et al.*, 2012; KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI *et al.*, 2005).

O modo de ação das pectinases é representado na Figura 2.

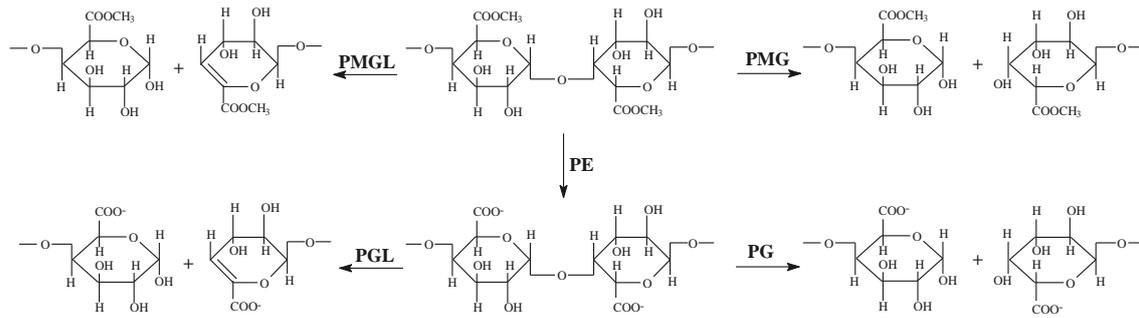


FIGURA 2 - Modo de ação das pectinases: PG - poligalacturonases; PMGL - pectina liase; PMG - Polimetilgalacturonase; PE/PME - pectinametilesterase; PGL – pectato liase (SAKAI, 1992)

As enzimas que hidrolisam as substâncias pécnicas são largamente conhecidas como enzimas pectinolíticas ou pectinases, que incluem poligalacturonases (PG), pectinaesterase ou pectinametilesterase (PME), pectina liase (PMGL ou PL) e pectato liase (PGL) (YADAV *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Poligalacturonases (PG)

As poligalacturonases são uma das várias classes de enzimas de degradação de pectina. Seus substratos são substâncias pécnicas, que têm uma estrutura comum, composto de  $\alpha$ -1,4 ligado à unidades de ácido galacturônico, mais ou menos esterificados. Eles ocorrem como material estrutural na parede primária e no meio de lamelas de plantas superiores, mostrando uma grande diversidade em função da fonte natural (SCHNITZHOFER *et al.*, 2007).

As poligalacturonases são enzimas que catalisam hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico. O ácido poligalacturônico pode ser despolimerizado por hidrólise pelas endo-poligalacturonases (endo-PG) e exo-poligalacturonases (exo-PG). As endo-PG hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das cadeias de ácido poligalacturônico por um mecanismo aleatório de ataque, enquanto as exo-PG hidrolisam tais cadeias de forma sequencial, a partir de seu extremo não redutor (TORRES *et al.*, 2011).

As endo-poligalacturonases (EC 3.2.1.15) são produzidas por vegetais superiores, fungos filamentosos, bactérias e muitas leveduras. Elas também são encontradas em planta superiores e alguns nematóides parasitas de plantas. As Endo-PG causam uma rápida queda na viscosidade do substrato. A taxa e o grau de hidrólise caem rapidamente com o grau de esterificação da pectina. Entre as PGs obtidas de

fontes microbianas diferentes, a maioria tem a faixa de pH ótimo de 3,5 a 5,5 e ótima faixa de temperatura de 30°C a 50°C, no caso de algumas enzimas de *A. niger* o pH ótimo é 4,0, o que viabiliza o seu largo emprego no processamento de frutas (JAYANI *et al.*, 2005).

As exo-poligalacturonases (EC 3.2.1.67) também são encontradas em vegetais superiores, fungos filamentosos, algumas bactérias e no trato intestinal de alguns insetos. As exo-PG podem ser divididas em dois tipos: fúngicas exo-PG que produzem ácido monogalacturônico como produto final principal, e as bacterianas exo-PG que produzem ácido digalacturônico como produto final principal. As exo-PG vegetais têm sido particularmente estudadas nos últimos anos, pois atacam o ácido poligalacturônico no extremo não-redutor e são capazes até de degradar dímeros (CASTILHO, 1997; JAYANI *et al.*, 2005).

As funções fisiológicas das PGs ainda estão sob investigação, mas o envolvimento de PGs fúngicas nos processos iniciais da infecção das plantas parecem ser evidentes, um aspecto comum é muitas vezes a patogenicidade vegetais de organismos, no qual PGs parecem ter um importante papel dentro do processo de infecção. Industrialmente, estas enzimas tem atraído grande interesse, devido a um número crescente de diferentes aplicações, como exemplo de aplicação clássica, a clarificação de frutas. Quando o potencial das substâncias pécicas como fibras alimentares foi reconhecida, uma nova área surgiu, a preparação de oligossacarídeos a partir de polímeros pécicos e a última aplicação na área de processamento de algodão, PGs foram aplicadas com sucesso na assim chamada sequências *bioscouring*. Como um organismo adequado para a produção industrial de PG o fungo *A. niger* é utilizado, não só por causa da grande quantidade de enzima produzida, mas também devido a síntese concomitante de várias substâncias ser possível (SCHNITZHOFER *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2011).

### **2.2.2 Pectinametilesterases (PME)**

A pectinametilesterase catalisa a desesterificação de pectina em ácido pécico, com um menor grau de esterificação (TEREFE *et al.*, 2009), gerando grupos carboxila livres e liberando prótons. A pectina dimetilesterificada pode sofrer despolimerização por glicosidases (SERVILLO *et al.*, 2004).

A pectinametilesterase (EC 3.1.1.11) é uma enzima de origem vegetal ou microbiana que catalisa a hidrólise específica da ligação éster metílico em C-6 de um resíduo de ácido galacturônico no homopolímero linear da pectina (1→4) ligado a  $\alpha$ -D-ácido galacturônico, alterando assim o grau e o padrão de esterificação de metila e liberando metanol e prótons (JOLIE *et al.*, 2010).

### **2.2.3 Polimetilgalacturonato-liases ou pectina liases (PMGL)**

As pectina liases são as únicas enzimas capazes de despolimerizar a pectina altamente esterificada em moléculas pequenas, sem ação prévia de outras enzimas. Elas atuam quebrando as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 por transeliminação, mecanismo que resulta na formação de 4,5 oligogalacturonatos insaturados, sem afetar o teor de ésteres da cadeia de polímeros que são responsáveis pelo aroma de frutas específicas, enquanto as outras agem sequencialmente para degradar completamente a molécula de pectina (YADAV *et al.*, 2008).

As pectina liases são produzidas por fungos filamentosos e não são registradas as suas ocorrências em vegetais superiores. Todas as pectinas liases conhecidas são endo enzimas, as quais despolimerizam as pectinas altamente esterificadas aleatoriamente, causando uma rápida queda de viscosidade. Os produtos da despolimerização são, principalmente, oligômeros parcialmente metoxilados (SAKAI, 1992).

Esta enzima tem potencial biotecnológico em indústrias de suco de frutas, devido ao fato de que degrada a pectina, sem perturbar o grupo éster, que é responsável pelo aroma específico do suco e também pela não formação de metanol, que é tóxico (YADAV *et al.*, 2008). Outro importante papel, destas enzimas, no processamento de frutas por exemplo, é a despectinização do suco de maçã (SAKAI *et al.*, 1992)

Embora seu pH ótimo seja 8,0, em presença de cálcio, quando usado como substrato pectinas menos metoxiladas podem existir pH ótimos secundários inferiores. Portanto, a enzima pode ainda catalisar a degradação da pectina (ROBINSON, 1991).

### **2.2.4 Poligalacturonato-liases ou pectato-liases (PGL)**

A enzima pectato liase catalisa a clivagem aleatória das cadeias de poligalacturonato ou pectina por um mecanismo de transeliminação que resulta na

formação de uma dupla ligação entre C4 e C5 no final não redutor, com eliminação de CO<sub>2</sub> (KLUG-SANTNER *et al.*, 2006; DAMAK *et al.*, 2011).

As pectato endo-liases quebram as ligações glicosídicas aleatoriamente, enquanto as pectato exo-liases atacam as cadeias principais sequencialmente (DAMAK *et al.*, 2011).

### ***2.3 Produção de pectinases em fermentação submersa***

As preparações de pectinases mais comumente utilizadas são de origem fúngica, principalmente de *Penicillium* e *Aspergillus* (SANTOS, 2007). Cepas do fungo filamentosso *A. niger* são as mais utilizadas na produção comercial de pectinases porque são classificadas como “geralmente consideradas como seguras”, o que significa que as enzimas derivadas deles são aceitáveis para uso na indústria de alimentos (MALVESSI & SILVEIRA, 2004).

De acordo com Fontana *et al.* (2009), meios de cultura com um equilíbrio adequado de açúcares simples e pectina apresentam melhores resultados na produção de enzimas pectinolíticas no processo de fermentação submersa.

Enzimas pectinolíticas podem ser produzidas tanto em fermentação em estado sólido como em fermentação submersa (FONTANA *et al.*, 2009). O processo submerso apresenta maior produção em escala industrial e um maior controle físico-químico do processo fermentativo (CASTRO & PEREIRA 2010).

Os processos submersos consistem naqueles em que o micro-organismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, em fermentadores providos de agitação e aeração (micro-organismos aeróbios) (REGULY, 2000; BASTOS, 2012; COUTO & SANROMÁN 2006) e outros controles, tais como: medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos micro-organismos (CASTRO & PEREIRA 2010; BASTOS, 2012)

Os processos fermentativos podem substituir processos puramente químicos de síntese orgânica. No entanto, aqueles utilizados em escala industrial geralmente dependem da capacidade do micro-organismo responsável em proporcionar bom rendimento econômico do produto, a partir de um substrato barato e disponível, da facilidade de recuperação ou obtenção do produto visado, sob forma pura ou, conforme

o caso, pronta para o uso e da impossibilidade ou dificuldade de se obter o produto através de outros processos (REGULY, 2000).

#### ***2.4 Processos de recuperação de biomoléculas***

A purificação de produtos biotecnológicos é fundamental na obtenção de enzimas com alto grau de pureza, o que é fundamental para sua aplicação industrial. Após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (MALDONADO, 2006).

É importante enfatizar que o conceito de grau de pureza “aceitável” varia de acordo com a aplicação da proteína isolada. A eficácia e a economia do processo de purificação frequentemente determinam o destino do produto no mercado. Por exemplo, enzimas utilizadas em detergentes, em síntese orgânica, na indústria têxtil, de couro, polpa e papel, e alimentos, usualmente não requerem elevados graus de pureza. Por outro lado, proteínas terapêuticas requerem alto nível de pureza (MONDAL *et al.*, 2006).

Na extração e na purificação de uma enzima, normalmente, se faz necessária a utilização de diferentes métodos de purificação para se obter os produtos desejados, incluindo, no caso de purificação de pectinase, os métodos convencionais, tais como filtração em gel, interações hidrofóbicas ou cromatografia de troca iônica. Os processos de purificação convencionais normalmente empregam várias etapas, são descontínuos, consomem elevados períodos de tempo, bem como trabalho intensivo, contribuindo para o aumento do custo e podendo causar a perda de rendimento e qualidade do produto (MEHRNOUSH *et al.*, 2011).

A separação e a purificação de enzimas a partir de meios de cultivo constituem uma parte fundamental no cálculo econômico final da viabilidade de sua produção. Por esta razão, existe a necessidade de uma técnica de biosseparação eficiente e econômica em grande escala para atingir elevados graus de pureza e recuperação, mantendo a atividade biológica da enzima (ANTOV *et al.*, 2004).

Existe interesse em métodos eficientes para a separação e purificação que sejam de baixa tecnologia e suficiente para preservar a atividade biológica das proteínas, destacam-se o sistema aquoso bifásico (SAB) e a precipitação com solventes orgânicos.

### 2.4.1 Sistemas aquosos bifásicos

A purificação de enzimas por sistemas aquosos bifásicos (SABs) é altamente eficaz, mantendo um elevado nível de atividade da enzima (MACIEL *et al.*, 2014). Os SABs são uma importante técnica de partição de proteínas, pois são biocompatíveis, de fácil escalonamento, simples de operar e permitem tanto a seleção específica quanto o rápido processamento. Ao particionar-se a proteína específica para uma fase e os contaminantes da proteína para outra em condições apropriadas, resulta na separação, purificação e recuperação de materiais biológicos em uma única etapa (OOI *et al.*, 2009; NANDINI & RASTOGI, 2011). A partição de compostos é complexa nestes sistemas, sendo que a interação de um composto com cada uma das fases inclui ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas principalmente na superfície (MARCOS *et al.*, 2002).

O SAB, que integra a concentração, clarificação e purificação inicial, tornou-se um método desejável para a purificação e recuperação de vários produtos biológicos. O baixo custo de material deste método e a desnaturação mínima de biomoléculas torna o SAB muito atraente para a obtenção de enzimas industriais em comparação com os métodos convencionais de purificação (AMID *et al.*, 2013).

O sistema envolve a mistura de uma solução aquosa de dois polímeros imiscíveis, tais como polietileno glicol (PEG)/dextrana, ou um polímero e uma solução de eletrólito, tais como PEG e citrato de sódio (AMID *et al.*, 2013) ou PEG e sulfato de amônio (HAGHTALAB & JODA, 2009), ou um solvente orgânico e um sal (OOI *et al.*, 2009). Sistemas com álcool e/ou à base de sal tem recebido menos atenção em estudos de purificação, quando comparado com o polímero/sal e sistemas polímero/polímero (OOI *et al.*, 2009).

A segregação lenta, o elevado custo de alguns polímeros (por exemplo, dextrana) e complicações em isolar as moléculas biológicas purificadas a partir da fase polímero são as desvantagens de um método SAB que emprega misturas polímero/polímero ou polímero/sal. Em contraste um SAB utilizando um solvente/sal orgânico pode ser empregado como um eficiente método para a purificação de aminoácidos, proteínas e biomoléculas. As vantagens deste sistema incluem a sua alta polaridade, baixa viscosidade e a recuperação simples dos solventes orgânicos por evaporação. Além disso, um SAB é barato e tem baixa toxicidade ambiental (AMID *et al.*, 2013).

Outros sistemas aquosos bifásicos de grande destaque são compostos pela adição de dois polímeros solúveis em água ou um polímero solúvel em água e um componente de baixa massa molar, como sais inorgânicos. A utilização destes sistemas apresenta diversas vantagens quando comparado a outras técnicas de separação. Eles mostram boa resolução, alto rendimento, curto tempo para separação de fases e custos relativamente baixos, quando comparados a técnicas cromatográficas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; HAGHTALAB & JODA, 2009).

Além disso, os SAB são facilmente dimensionáveis e permitem a reciclagem dos reagentes utilizados no processo. Seu alto teor de água implica em alta biocompatibilidade e tensão interfacial baixa, minimizando a degradação de biomoléculas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estes sistemas apresentam ainda vantagens ambientais como baixa toxicidade e inflamabilidade mínima (MARTINS *et al.*, 2008).

Os estudos de purificação em SAB são na sua maioria empíricos, diante da complexidade que apresentam. As melhores condições são geralmente atingidas pela variação sistemática de vários fatores tais como peso molecular do polímero, concentração de sal e pH (MARCOS *et al.*, 2002). A escolha do sal utilizado tem impacto direto na separação, concentração e purificação devido à sua influência na formação do sistema reacional (NANDINI & RASTOGI, 2011).

Sistemas polímero, sal e água são particularmente adequados para a partição de compostos devido ao seu custo relativamente baixo e baixa viscosidade, o que permite uma separação de fases eficiente (CARVALHO *et al.*, 2007).

O acréscimo de NaCl no sistema aquoso bifásico foi baseado nos relatos de que este favorece a transferência das proteínas para a fase superior (rica em PEG) do sistema de duas fases (SARUBBO *et al.*, 2004).

As demandas industriais e econômicas, *downstream processing*, para a extração e purificação de biomoléculas com alta pureza e rendimento do produto estão crescendo rapidamente. O sistema aquoso bifásico fornece um método para separar misturas de biomoléculas por extração em processamento de fluxo para baixo. A base de particionamento depende de propriedades da superfície das partículas e moléculas que incluem carga, tamanho e hidrofobicidade. Além disso, o traço mais característico de um sistema de duas fases é que o teor de água de tal sistema é tão elevado, como 85 % a 99 %. Quando é complementada com adequado tampão e sais permite fornecer um meio adequado para materiais biológicos. Uma grande variedade de biomoléculas (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, vírus e células inteiras) foram separadas usando esta técnica,

especialmente proteínas, uma vez que consome menos tempo e tem o potencial para alto rendimento e alta pureza, envolve baixo investimento, menos energia e custos de processos. Por outro lado, um processo de extração líquido-líquido requer o conhecimento do comportamento de fase do sistema de projeto de engenharia e otimização de processos (HAGHTALAB & JODA, 2009).

Vários estudos têm sido conduzidos para encontrar um SAB apropriado para diferentes biomoléculas, bem como condições adequadas de funcionamento para a partição de diferentes biocompostos. A distribuição seletiva de constituintes no SAB pode ser afetada por diferentes fatores, como a natureza e tamanho dos biocompostos, estrutura molecular e tamanho da cadeia do polímero, tipo de sal, pH, composição inicial do sistema e temperatura (CARVALHO, 2007).

Desde 1956, quando Albertsson mostrou o potencial de sistemas aquoso de duas fases como uma técnica de separação, vários trabalhos desenvolveram estes sistemas para aplicação em determinação, pré-concentração, purificação e separação de diferentes solutos, tais como fenol, organelas celulares, proteínas, membranas, DNA, anticorpos, as nanopartículas, as moléculas de corante, e íons (DE LEMOS *et al.*, 2010).

Recentemente, a aplicação de SAB tem sido focada em extrações e purificação de enzimas, incluindo celulasas, catalase, colagenases,  $\alpha$ -galactosidase, lacase, lipase, pectinase, fitase, proteases e tanase (KAVAKÇIOĞLU & TARHAN, 2013; MACIEL *et al.*, 2014; NANDINI & RASTOGI, 2011; MEHRNOUSH *et al.*, 2011; OOI *et al.*, 2009). No entanto, raro são os estudos abordados na literatura sobre o fracionamento e purificação de pectinases (exo-PG, PME e PMGL) (ANTOV & OMORJAN, 2009; MACIEL *et al.*, 2014; MEHRNOUSH *et al.*, 2011).

Informações sobre o diagrama de fases para este tipo de sistema, bem como a modelagem termodinâmica do equilíbrio de fases, são essenciais para o desenvolvimento, *design*, simulação, otimização e operação desses processos de separação. Há uma quantidade significativa de dados de equilíbrio de fase para SAB polímero-polímero, no entanto, estes sistemas são difíceis para uso em condições industriais, devido à sua alta viscosidade e custo. Os SAB polímero-sal são mais adequados, pois apresentam menor viscosidade e maior seletividade (CUNHA & AZNAR, 2009).

O sistema ternário se divide em duas fases, ambas ricas em água, acima de uma certa concentração crítica de polímero ou sal. Uma proteína e enzima ou qualquer outra biomolécula dentro deste tipo de sistema irá se distribuir entre as duas fases em

equilíbrio. Esta partição é um método extremamente favorável para a recuperação e purificação de proteínas ou enzimas, já que as condições são brandas, com ambas as fases de 75 % a 90 % em água, minimizando a degradação do produto (CUNHA & AZNAR, 2009).

A composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio termodinâmico é geralmente representada em um diagrama de fase retangular, apresentado na Figura 3. Esta representação gráfica é de grande importância para os estudos de partição, pois é utilizada inicialmente como ferramenta básica para o desenvolvimento de um processo de extração. Os dados de equilíbrio apresentados nesses diagramas estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema, e auxiliam na compreensão dos fatores que governam a partição de um soluto qualquer nos SAB (DA SILVA *et al.*, 2006).

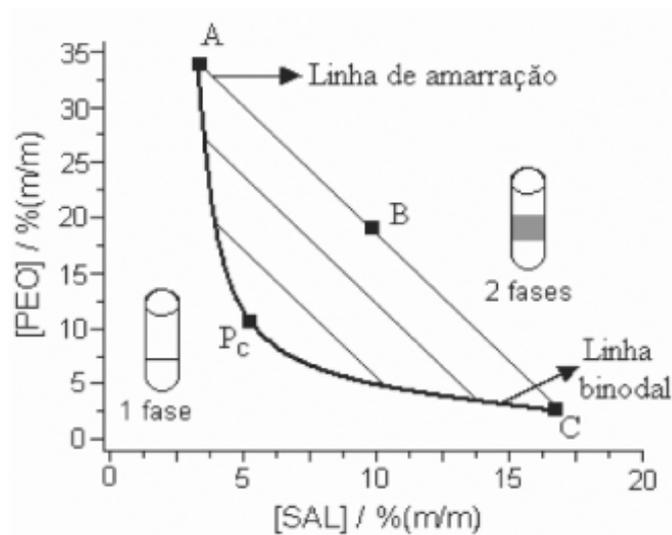


FIGURA 3: Diagrama de fases, expresso em coordenadas retangulares, de um SAB formado por um polímero e um sal (DA SILVA *et al.*, 2006).

Neste diagrama de fase (Figura 3), a abscissa representa a concentração de sal e a ordenada, a concentração do polímero presente no sistema. Dessa forma, o diagrama informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo, sendo essas duas regiões separadas pela linha binodal (AP<sub>c</sub>C). A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio. Existem diferentes métodos para obtenção da

linha binodal, sendo geralmente utilizados os de titulação turbidimétrica e de análise da composição das fases (DA SILVA *et al.*, 2006).

No diagrama de fase são também representadas as linhas de amarração (ex: linha ABC) que, para determinada composição global do sistema (ponto B), fornece a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos A (fase superior) e C (fase inferior). A obtenção das linhas de amarração é de grande importância, pois todas as misturas com composições globais representadas por pontos, pertencentes a uma mesma linha de amarração, fornecerão fases superiores com propriedades termodinâmicas intensivas (ex: composição) idênticas, porém com propriedades extensivas (ex: volume) diferentes. O mesmo princípio aplica-se às fases inferiores (DA SILVA *et al.*, 2006).

Em geral, a distribuição de proteínas entre as duas fases aquosas dos SAB é caracterizado por um parâmetro denominado coeficiente de partição,  $K_{part}$ , um adimensional que é dado pela equação 1 (PESSOA & KILIKIAN, 2005).

$$K_{part} = \frac{C_{topo}}{C_{fundo}} \quad (1)$$

Onde:  $C_{topo}$  = concentração do soluto na fase de topo (g/L);  $C_{fundo}$  = concentração do soluto na fase de fundo (g/L).

O valor de  $K_{part}$  é frequentemente utilizado para avaliação da extensão das separações nos sistemas de duas fases aquosas. Coeficientes de partição significativamente distintos para a molécula de interesse e para as demais moléculas indicam a ocorrência de purificação. Este depende de uma série de fatores como massa molecular do polímero, presença de eletrólitos, temperatura, tamanho de proteína e concentração das substâncias formadoras do sistema (SILVA *et al.*, 2000).

Ainda que o valor de  $K_{part}$  da molécula-alvo seja elevado, assim como a razão entre valores de  $K_{part}$  (molécula-alvo e contaminantes), a viabilidade da aplicação da extração em SAB requer rendimentos elevados da molécula desejada em uma dada fase do sistema (PESSOA & KILIKIAN, 2005). Duas proteínas podem ser separadas de uma mistura inicial mediante a sua partição em ambas as fases com valores diferentes de  $K_{part}$ . Quanto maior ou menor que 1 for o coeficiente de partição, mais o componente

tenderá a se concentrar na fase superior ou inferior, respectivamente (CHUMPITAZ, 2002).

O  $K_{part}$  é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar esses valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o  $K$  está associado (MINAMI, 1997).

Segundo Cunha *et al.* (2009), há uma quantidade significativa de dados de equilíbrio de fase para SAB polímero-polímero; no entanto, estes sistemas são difíceis para uso em condições industriais, devido à sua alta viscosidade e custo. Os SAB polímero-sal são mais adequados por apresentarem menor viscosidade e maior seletividade.

Os trabalhos envolvendo a purificação de pectinases por sistema aquoso bifásico ainda são raros. Recentemente, Maciel *et al.* (2014) estudaram a purificação de poligalacturonases de *Aspergillus niger* URM 5162 por sistemas aquoso bifásicos formado por polietilenoglicol e fosfato, altos valores das variáveis de resposta foram encontrados para a endo-PG e exo-PG, coeficiente de partição ( $K$ ) de 1,23 e 2,40, rendimento ( $Y$ ) de 74,04 % e 17,97 %, fator de purificação ( $FP$ ) de 8,18 e 1,98 e seletividade ( $S$ ) de 24,68 e 48,07, obtidos com 12,5 % (m/m) de PEG 8000 g/mol e 25 % de fosfato (pH 6,0), respectivamente.

Mehrnoush *et al.* (2011) investigaram a purificação da pectinase extraída de polpa de manga. Os efeitos de diferentes parâmetros como massa molar do polietilenoglicol - PEG (2.000 a 10.000), concentração do fosfato de potássio (12 % a 20 %, m/m), pH (6 a 9) e concentração de diferentes sais neutros (0 % a 8 %, m/m), sobre o comportamento de partição da pectinase foram investigados. O coeficiente de partição da enzima diminuiu com o aumento da massa molar do PEG, sendo as condições ótimas para a purificação 14 % de PEG 4.000, 14 % de fosfato de potássio e 3 % de NaCl em pH 7,0, obtendo-se um fator de purificação de 13,2 com 97,6 % de rendimento.

Lima *et al.* (2002) avaliaram a influência de diferentes massas molares de PEG (400, 600, 1000, 1450, 3350, 8000 e 10000; 50%, m/v), tampão fosfato de potássio pH 7,0 e a adição de cloreto de sódio (30%, m/v) em sistema aquoso bifásico no particionamento de enzimas pectinolíticas. Os melhores resultados sobre os coeficientes de partição - Ke (5,35) e a recuperação - R (89,5 %) foram obtidos com o sistema PEG 400/fosfato com NaCl para a exo-poligalacturonase, PEG 600/fosfato para a pectina liase (PMGL), com Ke de 43,18 e R de 98,5 % e pectina esterase (PE), Ke de 1,51 e R de 69,6 %; PEG 10000/fosfato para a endo-poligalacturonase, Ke de 1,35 e R de 53,5 %. Os melhores fatores de purificação foram observados na fase superior para os sistemas contendo PEG de alta massa molar e sem adição de NaCl, ou seja, PEG 6000 para a exo-poligalacturonase (5,49 vezes), PEG 10000 para as enzimas endo-poligalacturonase (16,28 vezes), pectina esterase (16,64 vezes) e pectina liase (14,27 vezes).

Um estudo utilizando um SAB diferenciado foi descrito por Ooi *et al.* (2009). Estes autores estudaram a eficácia de um sistema aquoso bifásico baseado em álcoois e sais para recuperar lipase derivada de *Burkholderia pseudomallei*. Nove sistemas bifásicos, composto por diferentes álcoois (etanol, 2-propanol e 1-propanol) e sais (sulfato de amônio, fosfato de potássio e citrato de sódio) foram investigados. A estabilidade da lipase em cada uma das soluções foi testada, e diagramas de fases foram construídos para cada sistema. A eficiência ótima de partição para a purificação da lipase foi obtida em um SAB composto de 16 % (w/w) de 2-propanol e 16 % (w/w) de fosfato de potássio na presença de 4,5 % (w/v) de NaCl, obtendo-se um fator de purificação de 13,5 e um rendimento de 99 %.

#### **2.4.2 Precipitação com solventes orgânicos**

Na precipitação com solventes orgânicos a separação ocorre pela conversão de solutos em sólidos, que pode ser posteriormente removido por separação sólido/líquido. Idealmente, a precipitação deve resultar tanto em concentração como em purificação, mas na realidade o primeiro é mais eficaz. Por esta razão esta técnica é frequentemente usada nas fases iniciais das operações *dowstream*, reduzindo o volume de fases posteriores. No entanto, para misturas menos complexas, tais como enzimas extracelulares, a precipitação é também uma maneira eficaz de alcançar algum grau de

purificação, mas, de fato, a enzima é concentrada em vez de purificada (GLATZ, 1990, GILL *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007).

As principais vantagens de se empregar a precipitação para a concentração e purificação são de que esta técnica não necessita de interrupção, requer equipamento simples, facilidade de aumento de escala e da possibilidade de utilização com um grande número de precipitantes, incluindo alguns de baixo custo, como o etanol, que é amplamente produzido no Brasil e no mundo (SOARES *et al.*, 2012). Este sistema já foi aplicado à purificação de inulinase (GOLUNSKI *et al.*, 2011; GILL *et al.*, 2006), trans glutaminase (CUI *et al.*, 2007), xilanase e  $\beta$ -xilosidase (CORTEZ & PESSOA JR., 1999)

Precipitantes que não desnaturam produtos biológicos (ex.: enzimas), também podem ser usados, sendo o precipitado formado geralmente mais estável do que o material solúvel (CORTEZ & PESSOA JR., 1999; GOLUNSKI *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2012). A maioria dos precipitantes comuns envolvem sais, polieletrólitos e solventes orgânicos (SOARES *et al.*, 2012; VALETTI *et al.*, 2012; BRAIA *et al.*, 2013; GOLUNSKI *et al.*, 2011).

Muitos solventes orgânicos miscíveis em água são capazes de precipitar enzimas, devido à sua constante dielétrica inferior a da água (80,10 a 20°C) aumentam a atração entre as moléculas de proteína e os agregados são formados até que as partículas atinjam proporções macroscópicas e precipitem. Esse fenômeno tem sido descrito como a remoção de água das esferas de hidratação das proteínas permitindo que as forças eletrostáticas tragam regiões de cargas opostas para junto da proteína. Neste caso, a água é removida tanto por substituição em massa pelo solvente orgânico e por estruturação de toda a molécula orgânica. Como consequência, a constante dielétrica é reduzida. As áreas hidrofóbicas da proteína tendem a tornar-se mais solúvel, mas, como indicado pela teoria de solubilidade, isto leva a uma redução na solubilidade da proteína. Quanto maior a temperatura, maior é a probabilidade de diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, a desnaturação das enzimas precipitadas (CORTEZ & PESSOA JR., 1999).

Solvente orgânico como exemplo, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) é um agente de cristalização de proteínas, altamente eficaz e precipita as proteínas no seu estado nativo. Concentrações moderadas (10 % a 40 %, v/v) de etanol tem sido utilizado como um dos métodos mais eficazes para fracionar proteínas de plasma em vários produtos terapêuticos funcionais. Em baixas temperaturas, os solventes orgânicos diminuem a

solubilidade de proteínas no estado nativo. No entanto, em contraste com os sais de *salting-out*, álcoois e outros solventes orgânicos são desestabilizadores da proteína e podem desnaturar proteínas em concentrações elevadas ou à temperaturas elevadas devido à suas interações favoráveis com grupos hidrofóbicos (YOSHIKAWA *et al.*, 2012).

Portanto, para fracionamentos com precipitantes orgânicos, temperaturas baixas (muitas vezes abaixo de 0°C) devem ser usadas para todas as enzimas, até as mais estáveis. Os álcoois metanol, etanol e isopropanol são importantes precipitantes industriais. O etanol provavelmente representa o equilíbrio ideal entre o efeito sobre a solubilidade e o caráter hidrofílico adequado para reduzir a desnaturação. O potencial do etanol para fracionamento de uma mistura muito complexa de proteínas é exibido no método de Cohn de produzir frações de soro sanguíneo. O fracionamento por este método é extremamente dependente da temperatura e isso gera um problema técnico, já que a adição de etanol à água gera calor e, como consequência, o controle preciso da temperatura é necessário. A precipitação com etanol é uma técnica promissora que pode ser aplicada a outros tipos de proteínas em uma escala industrial. Etanol, usado como agente precipitante, é o mais importante dos solventes, devido às suas propriedades físico-químicas, tais como a miscibilidade completa com água, boa depressão do ponto de congelamento, a ausência de misturas explosivas, alta volatilidade, inércia química, toxicidade baixa e de baixo custo, especialmente no Brasil (CORTEZ & PESSOA JR., 1999; GOLUNSKI *et al.*, 2011).

Cortez & Pessoa Jr. (1999) estudaram a precipitação fracionada da xilanase e  $\beta$ -xilosidase com etanol em concentrações de 20 %, 40 %, 60 % e 80 % em diferentes valores de pH (4,6, 5,9, 6,3 e 7,0), a fim de comparar o comportamento de  $\beta$ -xilosidase com o comportamento do total de xilanase presente no meio, sendo realizada em três etapas (pH 4,6, 4 °C e concentração de etanol de 20, 60 e 80 %). Na primeira etapa (etanol 20 %), cerca de 10 % de  $\beta$ -xilosidase e 80 % da proteína total precipitaram. Na segunda etapa (60 % etanol), 75 % da mesma enzima precipitou. O complexo xilanolítico restante (82 %) precipitou na terceira etapa (80 % de etanol). A análise de eletroforese mostrou que as enzimas, produzidas por *Penicillium janthinellum* do bagaço de cana, podem ser seletivamente separadas por precipitação com etanol de acordo com seus pesos moleculares. Os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_m$ ) de  $\beta$ -xilosidase antes e após as precipitações se mantiveram constantes.

## **2.5 Considerações Finais**

A purificação de proteínas consiste em um dos desafios da área de bioprocessos. Estudos sobre estratégias de purificação que utilizem processos simples e de baixo custo, mas que possibilitem purificar, concentrar e recuperar as enzimas são importantes do ponto de vista científico e industrial. O aumento do grau de pureza das preparações enzimáticas, sem aumentar o custo final da enzima, pode contribuir para ampliar as aplicações industriais destas enzimas, melhorando a qualidade final de diversos produtos que podem se beneficiar da tecnologia enzimática, já que o grau de pureza requerido para enzimas está diretamente relacionado com a aplicação na qual estas serão empregadas.

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) e a precipitação com solventes orgânicos vêm sendo estudados e relatados na literatura científica, como alternativas para a concentração e purificação de biocompostos, tais como enzimas. Com isso, faz-se necessário o estudo detalhado, a fim de determinar as variáveis e seus efeitos na obtenção de pectinases (exo-PG, PME e PMGL) purificadas, sem que os mesmos prejudiquem as atividades enzimáticas, a recuperação e que favoreçam, posteriormente, suas possíveis utilizações em processos industriais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentados os métodos referentes à produção e à purificação de pectinases por precipitação com solventes e em sistemas aquosos bifásicos.

#### 3.1 Preparo do inóculo do *Aspergillus niger* ATCC 9642

A cepa do *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi obtida de forma liofilizada, gentilmente doada pela FIOCRUZ (Brasil), mantida em Potato Dextrose Ágar (PDA-Difco®), subcultivada periodicamente e armazenada a 4 °C.

O *A. niger* ATCC 9642 foi cultivado por 7 dias a 30°C em um meio de cultivo contendo 39 g/L de Potato Dextrose Ágar (PDA - Difco®). Posteriormente, realizou-se a coleta dos esporos adicionando-se 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v) e pérolas de vidro esterilizadas ao frasco (erlenmayer), para uma melhor remoção desses. Para a contagem dos esporos, 1 mL da suspensão resultante foi diluído de 10 a 10<sup>3</sup> vezes em solução aquosa esterilizada de Tween 80 (0,1 %, v/v) e aproximadamente 0,5 mL da solução diluída foi transferido a uma câmara de Neubauer para realizar-se a contagem dos esporos (FREIRE, 1996), que foram utilizados na produção de enzimas via fermentação submersa.

#### 3.2 Produção das enzimas pectinases (*Exo-Poligalacturonase, Pectinametilesterase e Pectina liase*)

O fluxograma da produção das enzimas pectinases podem ser visualizados na Figura 4. As enzimas foram produzidas a partir de cepa do micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 9642, por fermentação submersa, em condições otimizadas do meio de cultivo constituído por pectina cítrica (Vetec) (32 g/L), L-asparagina (2 g/L), sulfato de ferro II (1 g/L) e fosfato de potássio (0,06 g/L) a 30°C, pH inicial 5,5, com agitação de 180 rpm e 27 h de cultivo em incubadora orbital (Nova Ética 430-RDB) segundo método descrito por Gomes *et al.* (2011). Após a etapa de fermentação, filtrou-se o meio, em papel filtro Whatman n. 1, obtendo-se o extrato enzimático bruto, o qual foi armazenado em embalagens plásticas de polietileno, com fechamento a vácuo, em quantidades de aproximadamente 100 mL, armazenados sob congelamento, -20 °C.

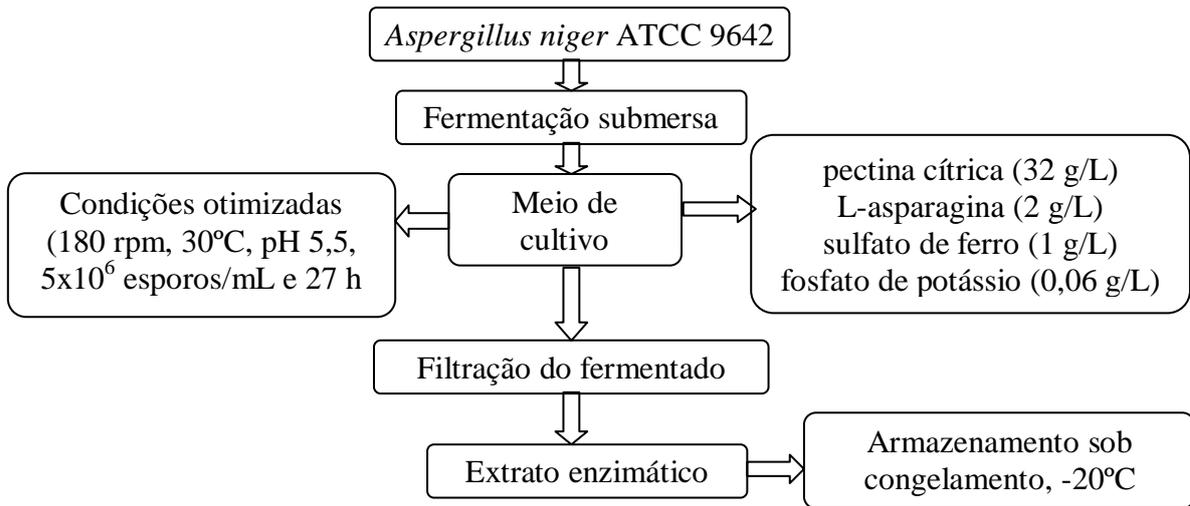


FIGURA 4: Fluxograma da produção das pectinases em fermentação submersa.

### 3.3 Purificação de pectinases por precipitação com solventes orgânicos

#### 3.3.1 Precipitação com álcool etílico

Um planejamento fatorial completo  $2^2$  (Planejamento central composto rotacional – CCRD, com 4 ensaios fatoriais, 4 pontos axiais e triplicata do ponto central) foi realizado empregando álcool etílico (Nuclear 99,5 °GL), conforme observado no fluxograma da Figura 5, com níveis de concentrações de 10, 22, 50, 78 e 90 % (v/v) e bombeado em diferentes vazões de 0,1, 3, 10, 17 e 20 mL/min, sendo que as variáveis fixas foram: extrato enzimático (10 mL), temperatura do banho de gelo (4°C), sob agitação lenta. As variáveis dependentes (respostas) avaliadas foram fator de purificação (FP) e a recuperação (R) das enzimas pectinases.

Após o bombeamento, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga MPW-351R) a 2150 x g por 15 min, a 4 °C. Foram preparadas amostras controle onde, no lugar do extrato enzimático, foi utilizada água destilada. As análises foram realizadas nas amostras do precipitado e do sobrenadante, subtraindo o valor da amostra controle. As amostras do precipitado foram ressuspensas com tampão acetato de sódio pH 5,5.

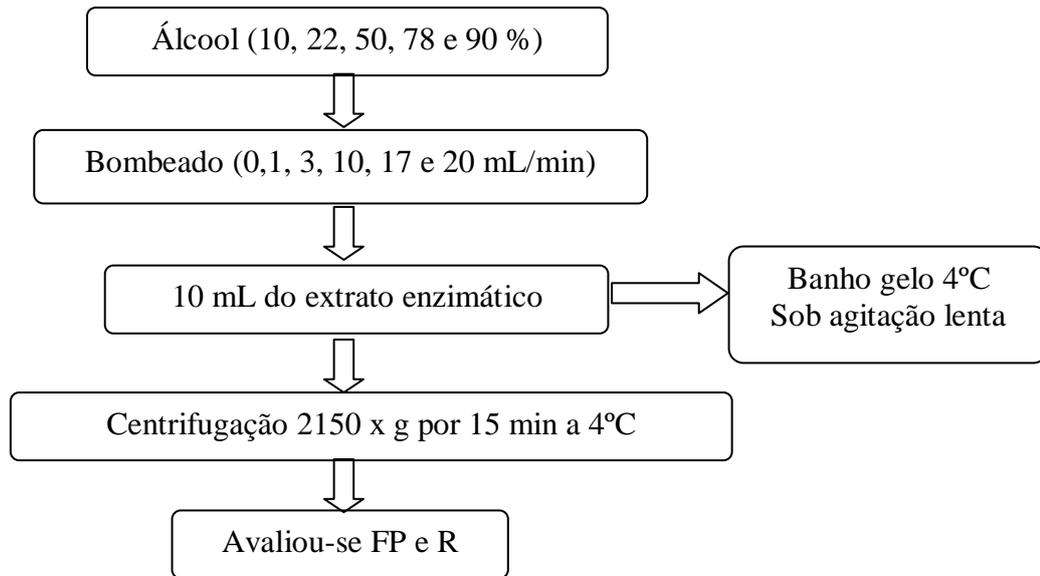


FIGURA 5: Fluxograma da precipitação com solventes orgânicos (álcool etílico e isopropílico).

### 3.3.2 Precipitação com acetona, álcool isopropílico e álcool n-propílico

A precipitação da enzima (exo-PG) foi testada empregando-se acetona (Vetec Química Fina), álcool isopropílico (Quimex) e álcool n-propílico (Synth) na concentração de 56 % (v/v) com vazão de 10 mL/min (ponto central) e, também, na concentração de 67 % (v/v) com vazão de 3 e 17 mL/min. Os álcoois isopropílico e n-propílico foram testados nas concentrações de 56 % e 67 % com vazão de 20 mL/min. Nos ensaios, foram preparadas amostras controle, substituindo-se o extrato enzimático por água destilada. As análises foram realizadas nas amostras do precipitado e do sobrenadante, subtraindo-se o valor da amostra controle. Nos ensaios, avaliaram-se o FP e R.

Baseado nos resultados dos ensaios anteriores, um planejamento fatorial completo  $2^2$  foi realizado utilizando álcool isopropílico nos níveis de concentrações de 10, 22, 50, 78 e 90 % (v/v) e bombeado nas vazões de 0,1, 3, 10, 17 e 20 mL/min, fixando-se 10 mL do extrato enzimático, sendo mantido em banho de gelo a 4 °C, sob agitação lenta. Após o bombeamento as amostras foram centrifugadas (Centrífuga MPW-351R) a 2150 x g por 15 min a 4 °C, conforme mostrado na Figura 5. Amostras controle foram preparadas onde, no lugar do extrato enzimático, foi utilizada água destilada. As análises foram realizadas nas amostras do precipitado e do sobrenadante, subtraindo-se o valor da amostra controle. As amostras do precipitado foram

ressuspendidas com tampão acetato de sódio pH 5,5. Nos ensaios avaliou-se o FP e R das enzimas pectinases (exo-PG, PME e PMGL). Os ensaios que levaram aos melhores resultados do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> utilizando álcool isopropílico foram realizados em triplicata.

### ***3.3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da melhor condição da precipitação com álcool isopropílico***

Sendo esta uma técnica de controle de pureza, onde as moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, forma ou carga. Das muitas técnicas de análise de proteínas, a eletroforese em gel é a mais versátil e facilmente aplicável (LAEMMLI, 1970).

#### ***3.3.2.1.1 Preparo das amostras***

Segundo Laemmli (1970), foi adicionado 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) em 100 µL das amostras a serem aplicadas no gel, contidas em tubos de centrífuga do tipo *ependorfs*. Esta solução foi armazenada em freezer durante aproximadamente 8 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, 4 °C por 30 min, retirado o sobrenadante, tomando cuidado para que o *pellet* não fosse desfeito. Foi adicionado 100 µL de uma solução aquosa gelada de acetona 90 %, a fim de lavar o *pellet* sem desfazê-lo, sendo este centrifugado como na etapa anterior. Novamente, o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90 % gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido com 50 µL do tampão da amostra (β-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 °C por 10 min.

#### ***3.3.2.1.2 Preparo do gel de resolução 15 %***

Em um béquer foram adicionados 4,925 mL de acrilamida / bis-acrilamida (30:0,8; m/m), 5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, 75 µL da solução de persulfato de amônio 10 % e 5 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para a célula de eletroforese, deixando aproximadamente 2,5 cm da célula livre, o restante da célula foi completada com água

destilada para formar uma linha reta sobre o gel, e deixado-o polimerizar por 40 min em temperatura ambiente, após a polimerização do gel a água foi retirada (LAEMMLI, 1970).

#### ***3.3.2.1.3 Preparo do gel de empilhamento 12 %***

Em um béquer foi adicionado 0,5 mL de acrilamida/bis acrilamida (30:0,8 m/m), 2,5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, 1,925 mL de água destilada, 75 µL da solução de persulfato de amônio e 7,5 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para a célula de eletroforese, sobre o gel de resolução que já estava polimerizado. Antes de aplicar o gel de empilhamento, o pente foi colocado para a formação dos poços para a aplicação das amostras. Depois da completa polimerização do gel de empilhamento (cerca de 30 min), o pente foi retirado (LAEMMLI, 1970).

#### ***3.3.2.1.4 Aplicação das amostras***

Após a polimerização do gel as amostras foram adicionadas. No primeiro poço foram adicionados 15 µL do padrão de massa molar (Fermentas Life Sciences), e nos outros poços foram adicionados 20 µL das amostras a serem analisadas.

A célula de eletroforese foi acomodada na cuba de eletroforese vertical e preenchida com tampão de corrida (contendo: 14 g de glicina, 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 3 g de Tris base e 1000 mL de água destilada) de modo a cobrir os poços do gel de empilhamento. A cuba foi fechada e ligada a uma fonte de alimentação de energia com corrente constante de 30 A e uma voltagem de 250 V, num tempo de aproximadamente 1 h para as amostras percorrerem o gel.

Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido, e o gel de resolução foi corado com o método de coloração com nitrato de prata durante aproximadamente 24 horas, até perfeita visualização das bandas. Posteriormente, colocou-se o gel em solução de ácido acético para parar a revelação.

### 3.4 Purificação de pectinases com sistemas aquosos bifásicos (SAB)

#### 3.4.1 “Screening” de diferentes condições do SAB – Sal/álcool

Diferentes concentrações de álcool e sal (16/16, 18/20, 20/20, 24/22 (%m/m)) foram testadas para avaliar o potencial de uso de SAB à base de álcoois. As soluções estoque foram preparadas com 40 % de sal (% m/m), o fluxograma do sistema pode ser visualizado na Figura 8. Os sais utilizados, neste sistema, foram o sulfato de amônio (Nuclear), fosfato de potássio (Vetec) e citrato de sódio (Nuclear), e os álcoois usados foram etílico (Nuclear), n-propílico (Vetec) e isopropílico (Vetec). Os sistemas foram preparados em tubos de centrífuga com 20 % de extrato enzimático, agitados em vórtex, deixado em repouso em temperatura ambiente por 15 min para separação das fases. Após, centrifugaram-se (Centrífuga MPW-351R) as amostras a 4000 x g por 10 min a 10°C. Foram preparadas amostras controle em cada ensaio onde, no lugar do extrato enzimático, foi colocada água destilada na mesma proporção. As análises foram realizadas com o precipitado e o sobrenadante, subtraindo-se os valores de atividade da amostra controle. Os resultados foram mensurados em termos de fator de purificação, coeficiente de partição ( $K_e$ ) e razão volume ( $R_{\text{razão volume}}$ ) e recuperação da exo-PG.

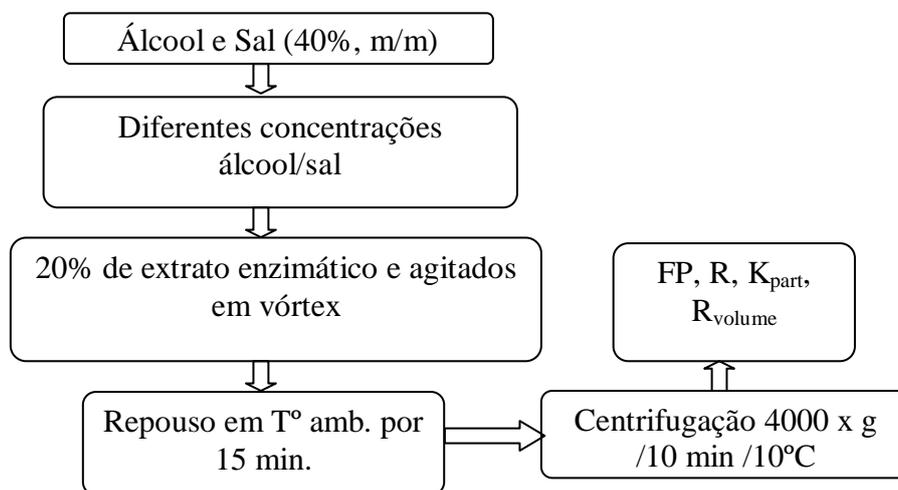


FIGURA 6: Fluxograma da purificação com SAB sal /álcool.

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, novos ensaios foram realizados empregando etanol/citrato, n-propílico/citrato e isopropílico/citrato e avaliados quanto à atividade das enzimas exo-PG, PME e PMGL. Os ensaios foram realizados em triplicata. A partir destes resultados um planejamento fatorial  $2^2$  foi montado variando a

concentração do álcool isopropílico de 18, 20 e 22 % e a concentração do sal citrato de sódio de 20, 22 e 24 % fixando-se as mesmas condições dos ensaios anteriores. As variáveis dependentes (respostas) foram: FP,  $K_e$ ,  $R_{\text{razão volume}}$  e R.

### 3.4.2 “Screening” de diferentes condições do SAB - PEG/Tampão fosfato de potássio

A Figura 7 apresenta o fluxograma da purificação com SAB PEG/fosfato. Os sistemas foram preparados a partir de soluções estoque de polietileno glicol – PEG (da Labsynth) 16, 18, 20 e 28 % (m/m) de diferentes massas molares (1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 Da) e tampão fosfato de potássio (Vetec Química Fina) 8 e 10 % (m/m), em pH 6,0 e 7,0 (mistura de fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico), cloreto de sódio (0 e 4,8 %) e água deionizada até completar a massa total de 30 g (pH 6,0) e 40 g (pH 7,0 e pH 8,0 apenas com PEG 6000), armazenadas a 5°C. Todos os sistemas foram preparados em tubos de centrifuga graduados. A quantidade de enzima adicionada nos sistemas foi sempre 8 g do extrato bruto, sendo o último componente adicionado ao sistema.

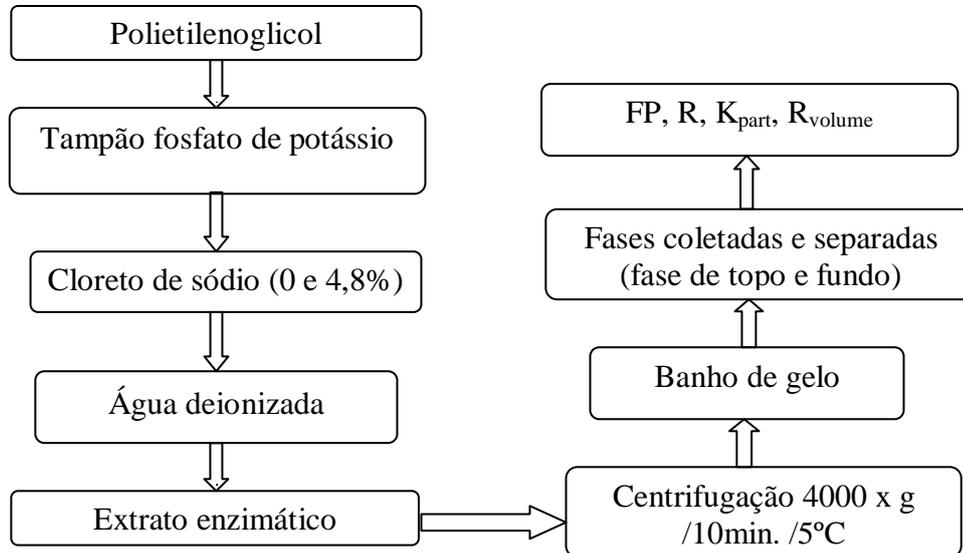


FIGURA 7: Fluxograma da purificação com SAB PEG/fosfato.

Os sistemas foram centrifugados (Centrífuga MPW-351R) 4000 x g por 10 min a 5°C, sendo mantidos em banho de gelo para completa separação das fases, as quais foram coletadas e separadas (fase de topo e fase de fundo) para posterior análise. As

amostras controle foram preparadas em cada ensaio, substituindo o extrato enzimático por água destilada. Nos ensaios avaliou-se o FP,  $K_e$ ,  $R_{\text{azão volume}}$  e R. Os ensaios que apresentaram os melhores resultados foram realizados em triplicata.

### 3.4.3 “Screening” de diferentes condições do SAB – PEG/Tampão citrato de sódio

Os sistemas foram preparados a partir de soluções estoque de polietilenoglicol – PEG (da Labsynth) 5, 10, 20, 25, 40 e 45 % (m/m) de diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) e tampão citrato de sódio (nuclear) 5, 6, 10, 20 e 25 % (m/m), em pH 5,0 e água deionizada até completar a massa total de 40 g, armazenadas a 5 °C. Todos os sistemas foram preparados em tubos de centrífuga graduados. A quantidade de enzima adicionada nos sistemas foi 8 g do extrato bruto, sendo o último componente adicionado no sistema, o fluxograma do sistema pode ser melhor visualizado na Figura 8.

Os sistemas foram centrifugados (Centrífuga MPW-351R) 4000 x g por 10 min a 5°C, sendo mantidos em banho de gelo para completa separação das fases. As quais foram coletadas e separadas (fase de topo e fase de fundo) para posterior análise. As amostras controle foram preparadas em cada ensaio, substituindo o extrato enzimático por água destilada. Nos ensaios avaliou-se o FP,  $K_e$ ,  $R_{\text{azão volume}}$  e R das enzimas exo-PG, PME e PMGL. Os ensaios que apresentaram os melhores resultados foram realizados em triplicata.

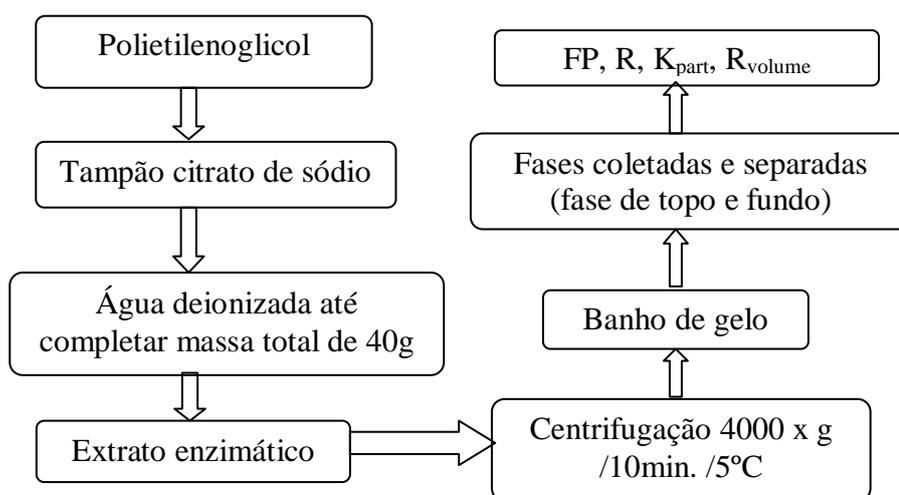


FIGURA 8: Fluxograma da purificação com SAB PEG/citrato.

### 3.5 Métodos Analíticos

#### 3.5.1 Atividade da *exo-poligalacturonase (exo-PG)*

A atividade pectinolítica da *exo-poligalacturonase (exo-PG)* foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalisílico (DNS), proposto inicialmente por Miller (1959), com algumas modificações.

Inicialmente, utilizou-se 1000  $\mu\text{L}$  de substrato (solução 0,5 % de pectina cítrica (Sigma) em tampão acetato de sódio pH 5,5) e incubou-se a 37 °C por 15 min para estabilização de temperatura. A seguir, 500  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático foram adicionados ao substrato e a reação incubada a 37°C por 6 min. Após retirou-se 500  $\mu\text{L}$  da mistura e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de DNS, a mistura foi mantida em ebulição por 5 min para formação de cor, resfriada em banho de gelo e adicionados 8,0 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para estabilização de cor. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640) a 540 nm, contra o branco. Para a atividade específica (U/mg) utilizou-se a atividade total da enzima (U/mL) em relação a proteína (mg/mL) quantificada pelo método de Bradford (1976) com albumina de soro bovino (Sigma A3294) como padrão. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ) segundo uma curva padrão estabelecida com ácido  $\alpha$ -D-galacturônico (Fluka Chemica, massa molecular 212,16) como açúcar redutor.

#### 3.5.2 Atividade da *pectinametilesterase (PME)*

A atividade da *pectinametilesterase* foi determinada pelo método proposto por Hultin *et al.* (1966). Preparou-se 30 mL de substrato (solução pectina cítrica 1 % em cloreto de sódio 0,2 M), ajustou-se o pH a 7,0 com hidróxido de sódio 0,01 mol/L em banho-maria a 20 °C. Em seguida, 1 mL de extrato enzimático foi adicionado ao substrato e o pH corrigido até 7,0 com hidróxido de sódio 0,01 mol/L por 10 min. Para a atividade específica (U/mg) utilizou-se a atividade total da enzima (U/mL) em relação a proteína (mg/mL) quantificada pelo método de Bradford (1976) com albumina de soro bovino (Sigma A3294) como padrão. Uma unidade de PME foi definida como a

quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação da pectina correspondente ao consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NaOH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ , sob as condições do ensaio.

### 3.5.3 Atividade da pectina liase (PMGL ou PL)

A atividade da pectina liase foi determinada pelo método sugerido por Ayers *et al* (1966). Primeiramente preparou-se 5 mL de substrato (solução pectina cítrica 1 % em tampão tris-HCl pH 8,5), adicionou-se 1 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol/L, 1 mL de extrato enzimático e 3 mL de água destilada, deixou-se incubado por 2 h a 30 °C. Após este tempo, adicionou-se 0,6 mL de solução de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  9 %, 0,6 mL de  $\text{NaOH}$  0,5 mol/L, centrifugou-se (Centrífuga MPW-351R) a 3000 x g por 10 min a 5 °C. No sobrenadante adicionou-se 3 mL de ácido tiobarbitúrico 0,04 mol/L, 1,5 mL de HCl 0,1 mol/L e 0,5 mL de água destilada. Levou-se à ebulição por 30 min, resfriando-se em banho de gelo. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640) a 550 nm, contra o branco. Para a atividade específica (U/mg) utilizou-se a atividade total da enzima (U/mL) em relação a proteína (mg/mL) quantificada pelo método de Bradford (1976) com albumina de soro bovino (Sigma A3294) como padrão. Uma unidade de atividade enzimática da PMGL foi definida como a quantidade de enzima que provoca uma alteração da absorbância de 0,01 a 550 u.a., nas condições do ensaio.

## 3.6 Determinação dos parâmetros de purificação/precipitação

### 3.6.1 Fator de purificação

O fator de purificação (FP) foi calculado através da Equação 2 (OOI *et al.*, 2009; ANTOV E OMORJAN, 2009; MEHRNOUSH *et al.*, 2011), sendo uma medida para acompanhar os sistemas de purificação.

$$FP = \frac{A_f}{A_i} \quad (2)$$

Onde,  $A_f$  = atividade específica da enzima da fase (U/mg);  $A_i$  = atividade específica do extrato bruto inicial (U/mg) (extrato bruto antes do equilíbrio de fases (SAB) ou da precipitação).

### 3.6.2 Recuperação da enzima

A recuperação da enzima foi calculada pela Equação 3 (OOI *et al.*, 2009; ANTOV E OMORJAN, 2009; MEHRNOUSH *et al.*, 2011).

$$R = \frac{A_f \times V_f}{A_i \times V_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde,  $A_f$  = atividade total do extrato enzimático da fase (U/mL);  $A_i$  = atividade total do extrato bruto na alimentação (U/mL);  $V_i$  = volume inicial do extrato bruto adicionado em mL;  $V_f$  = volume da fase em mL.

### 3.6.3 Razão volume

A razão de volume ( $R_{\text{razão volume}}$ ) do sistema foi determinada pela Equação 4 (NANDINI & RASTOGI, 2011).

$$R_{\text{razão volume}} = \frac{V_{\text{fase topo}}}{V_{\text{fase fundo}}} \quad (4)$$

Onde,  $V_{\text{fase topo}}$  é o volume da fase de topo, em mL, após o processo de purificação;  $V_{\text{fase fundo}}$  é o volume da fase de fundo, em mL, após o processo de purificação.

### 3.6.4 Coeficiente de partição

O coeficiente de partição ( $K_e$ ) foi calculado pela Equação 5 (NANDINI & RASTOGI, 2011; ANTOV E OMORJAN, 2009).

$$K_e = \frac{At_{\text{fase topo}} (U / mL)}{At_{\text{fase fundo}} (U / mL)} \quad (5)$$

Onde,  $At_{\text{fase topo}}$  = atividade total da enzima na fase de topo, em U/mL, após o processo de purificação;  $At_{\text{fase fundo}}$  = atividade total da enzima na fase de fundo, em U/mL, após o processo de purificação.

### ***3.7 Tratamento estatístico***

Os resultados de fator de purificação e recuperação das pectinases foram tratados estatisticamente segundo método de planejamento de experimentos, mediante análise dos coeficientes de regressão, dos efeitos estimados (gráfico de Pareto), da análise de variância (ANOVA), seguida de comparação das diferenças das médias pelo teste de Tukey e/ou t-student, a nível de 95 % de confiança, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste item, são apresentados os resultados e a discussão referentes às etapas de purificação das pectinases (exo-poligalacturonase, pectinametilesterase e pectina liase) empregando precipitação com solventes e/ou sais e sistemas aquosos bifásicos, no qual avaliou-se o fator de purificação, coeficiente de partição, razão volume, recuperação das enzimas e a massa molar pela técnica de eletroforese.

### ***4.1 Purificação de pectinases por precipitação com solventes orgânicos***

#### ***4.1.1 Precipitação com álcool etílico***

Alguns testes com etanol mostraram que este solvente causava a precipitação de proteínas do extrato enzimático. Assim, optou-se por realizar um planejamento fatorial para testar o efeito da concentração de etanol e taxa de adição deste ao extrato.

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$ , com os valores codificados (reais), dos ensaios de precipitação com etanol e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) das enzimas exo-PG, PME e PMGL na fase precipitada.

Para a purificação da enzima exo-PG empregando álcool etílico (Tabela 1), os resultados obtidos foram considerados baixos, sugerindo que a enzima não tenha sido precipitada pelo solvente. Por outro lado, a enzima foi detectada no sobrenadante, e a atividade específica aumentou nesta fase, mostrando a possibilidade de purificação de exo-PG por precipitação seletiva de proteínas contaminantes com etanol. O melhor resultado de FP pode ser observado com 50% de álcool e vazão de alimentação de 10 mL/min, entretanto os resultados obtidos de FP e R para esta enzima não foram considerados satisfatórios (0,33 vezes e 31,2 %). Outra hipótese para este comportamento pode estar relacionada à perda de atividade da enzima quando em contato com o solvente utilizado. No entanto, quando comparada a outros estudos que utilizaram a precipitação de inulinase como primeira etapa em uma estratégia de purificação, a precipitação com álcool etílico combinado a ultrafiltração mostrou ser eficiente, obtendo FP de 2,3 e R de 120,3 % da enzima (GOLUNSKI *et al.*, 2011).

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

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG		PME		PMGL	
	Concentração	Vazão	FP	R	FP	R	FP	R
	(%)	(mL/min)		(%)		(%)		(%)
1	-1 (22)	-1 (3)	0	1,2	0,01	2,8	0	0
2	+1 (78)	-1 (3)	0,09	12,2	0,2	27,8	0,65	266,4
3	-1 (22)	+1 (17)	0,02	1,7	0,76	77,8	0	0
4	+1 (78)	+1 (17)	0,27	9,4	2,25	77,8	0,10	5,4
5	-1,41 (10)	0 (10)	0,01	2,12	0,08	27,8	0	0
6	+1,41 (90)	0 (10)	0,05	8,2	0,1	16,7	0	0
7	0 (50)	-1,41 (0,1)	0,17	28,8	0,19	22,2	4,60	554,7
8	0 (50)	+1,41 (20)	0,11	13,6	0,48	58,3	4,76	578,6
9	0 (50)	0 (10)	0,28	29,8	0,48	50	0,88	91,9
10	0 (50)	0 (10)	0,29	29,7	0,45	50	0,70	91,8
11	0 (50)	0 (10)	0,33	31,2	0,42	44,4	0,67	84,2

Com relação à purificação da enzima PME (Tabela 1), o ensaio que apresentou os melhores resultados de FP e R, na fase precipitada, foi o ensaio 4 com valores de 2,25 vezes e 77,8 %, respectivamente. O método de precipitação mostrou ser eficiente na purificação e recuperação da enzima PME, vindo a acrescentar a literatura, já que nenhum trabalho anterior sobre este assunto havia sido encontrado. Os resultados de fator de purificação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4) que apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas, onde a vazão de reação, a concentração, a vazão de reação quadrática e a interação da vazão e a concentração apresentaram efeitos significativos positivos, indicando que o aumento da concentração e da vazão possivelmente acarretará no aumento do fator de purificação.

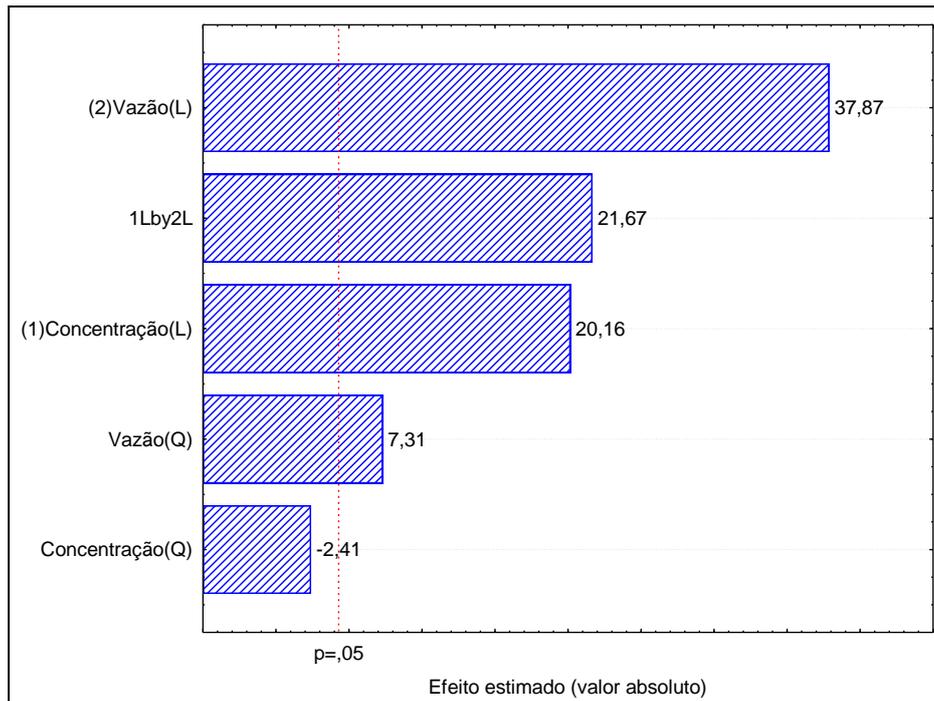


FIGURA 4: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  do precipitado, em relação ao FP da enzima PME, respectivamente.

Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a recuperação da enzima PME fase precipitada (Apêndice 1 – Tabela 1), demonstram o efeito quadrático significativo ( $p < 0,05$ ) negativo da concentração e positivo linear da vazão.

A Equação 6 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a R em função dos efeitos das variáveis significativas da enzima PME fase precipitada. O modelo foi validado pela análise de variância (Apêndice 1 - Tabela 2), onde o  $F_{\text{calculado}}$  apresentou-se 2,55 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com coeficiente de correlação de 0,86. Os efeitos que não foram significativos foram adicionados a falta de ajuste para a análise de variância.

$$R = 48,08 - 9,139 \times (C)^2 + 22,06 \times (V) \quad (6)$$

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

O modelo empírico permitiu a construção da curva de contorno, apresentada na Figura 5, onde observa-se que existe uma região de máxima de recuperação, próxima ao ponto central de concentração do álcool etílico e vazão superior a 17 mL/min.

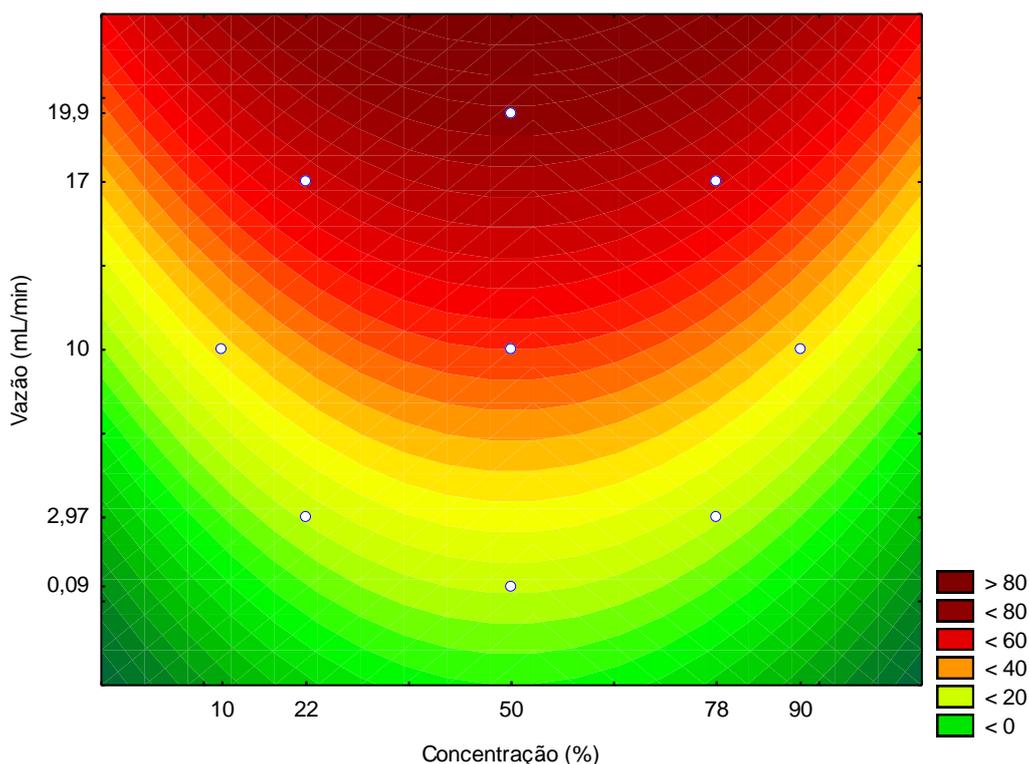


FIGURA 5: Curva de contorno para a R da PME da fase precipitada em função da concentração de álcool etílico e vazão de alimentação.

Os melhores resultados de FP e R da enzima PMGL (Tabela 1) foram obtidos nos ensaios 7 e 8 com valores de 4,76 e 4,60 para o FP e 578,6 e 554,7 % para a R, ambos utilizando 50 % de álcool etílico, mas com distintas vazões de alimentação (0,1 e 20 mL/min). Isto sugere que a concentração e a purificação desta enzima não depende do fluxo de alimentação do álcool etílico. Estes resultados são superiores aos encontrados por Perez-Fuentes *et al.* (2014) para a PMGL de *Penicillium purpurogenum*, os quais obtiveram uma atividade específica que aumentou de 0,55 U/mg para 4,72 U/mg, com um rendimento de 28,1 %, utilizando membranas de ultrafiltração de 10 kDa, diálise com sulfato de sódio e cromatografia de fenil de agarose. Em outro estudo sobre a purificação parcial de uma pectina liase extracelular de *A. niger*, Yadav & Shastri (2004), obtiveram um fator de purificação de 1,3 utilizando 60% de etanol na precipitação.

Os resultados do FP da fase precipitada da enzima PMGL, podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 6), sendo que a vazão apresenta efeito significativo quadrático positivo e a concentração quadrática negativa na recuperação da enzima PMGL.

Os resultados da R da fase precipitada da enzima PMGL, podem ser vistos pelo gráfico de Pareto (Figura 7), sendo que todas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo.

Valores de recuperação da enzima PMGL superiores a 100 %, como os encontrados nos ensaios 2, 7 e 8 (Tabela 1) fase precipitada, possivelmente podem ser atribuídos a dois motivos: i) há remoção de metabólitos ou metabólitos secundários durante a purificação, que inibem a atividade da enzima, e ii) a elevada concentração de sal e/ou proteína, os quais ajudam a manter a conformação da proteína na forma ativa (PAN *et al.*, 2001).

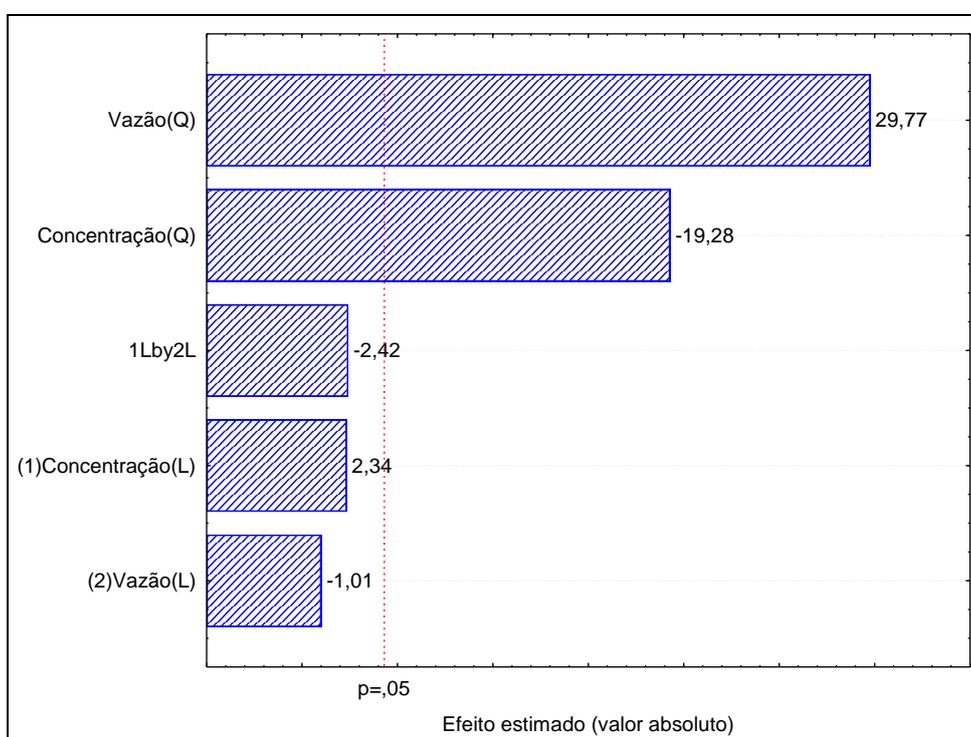


FIGURA 6: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$ , em relação ao FP do precipitado da enzima PMGL.

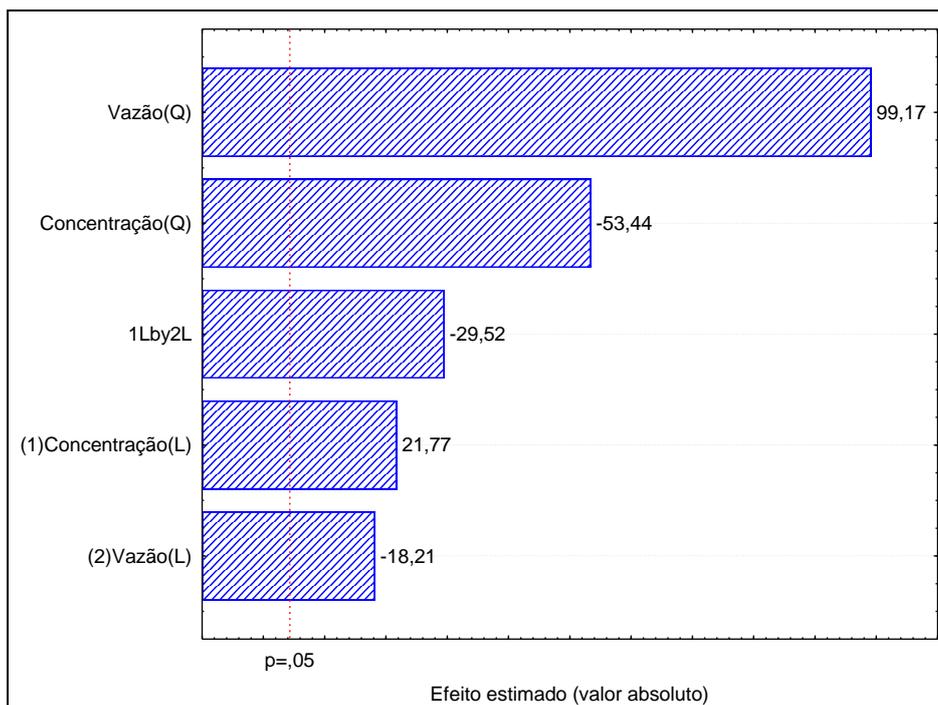


FIGURA 7: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$ , em relação a R do precipitado da enzima PMGL.

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$ , com os valores codificados (reais), dos ensaios de precipitação com etanol e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da enzima exo-PG, PME e PMGL na fase sobrenadante.

De acordo com a Tabela 2, utilizando-se álcool etílico, a fase sobrenadante foi a que apresentou, em apenas uma condição, maior FP (1,3) e R (51,3 %) da enzima exo-PG em comparação com a fase precipitada, o máximo FP foi obtido com 50% de álcool e vazão de alimentação de 10 mL/min. Kant *et al.* (2013) obtiveram FP de 1,68 para a PG de *A. niger* MTCC 3323 por precipitação com etanol 60 %, resultado próximo aos encontrados no presente estudo. Num estudo anterior, o fator de purificação da poligalacturonase de *Mucor circinelloides* encontrado foi de 2,12, utilizando 60% de etanol na precipitação (THAKUR *et al.*, 2010).

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

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG		PME		PMGL	
	Concentração (%)	Vazão (mL/min)	FP	R (%)	FP	R (%)	FP	R (%)
1	-1 (22)	-1 (3)	0,19	65,9	0	0	0,19	77,7
2	+1 (78)	-1 (3)	0,08	12,4	0,02	2,8	0,40	170,2
3	-1 (22)	+1 (17)	0,33	50,2	0,54	83,3	1,68	258,9
4	+1 (78)	+1 (17)	0,07	9,3	0,08	11,1	0,16	23,2
5	-1,41 (10)	0 (10)	0,16	58,3	0,09	33,3	0,60	291,5
6	+1,41 (90)	0 (10)	0,02	3,3	0,10	16,7	0,22	96,4
7	0 (50)	-1,41 (0,1)	0,34	29,4	0,35	44,4	1,56	204,5
8	0 (50)	+1,41 (20)	0,09	16,6	0	0	0,13	23,2
9	0 (50)	0 (10)	1,30	46,3	0,19	33,3	0,64	75,12
10	0 (50)	0 (10)	1,30	51,3	0,18	27,8	0,53	82,4
11	0 (50)	0 (10)	1,30	48,8	0,21	33,3	0,59	80,8

Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a recuperação da enzima exo-PG fase sobrenadante (Apêndice 1 – Tabela 3), mostram que a concentração e a vazão nos intervalos estudados afetam a recuperação da enzima exo-PG.

Os resultados da análise de variância para R da enzima exo-PG fase sobrenadante encontram-se no Apêndice 1 - Tabela 4. Permitiram dizer que o modelo codificado de segunda ordem é válido estatisticamente, pois o  $F_{\text{calculado}}$  apresentou-se 7,59 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , e o coeficiente de correlação de 0,98. A Equação 7 apresenta o modelo codificado para a recuperação do planejamento.

$$R = 48,769 - 21,57 \times (C) - 7,097 \times (C)^2 - 4,628 \times (V) - 11,03 \times (V)^2 \quad (7)$$

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

A adição de concentrações abaixo de 22 % de álcool etílico, com vazões próximas a 10 mL/min levou à máxima R da enzima exo-PG fase sobrenadante (Figura 8).

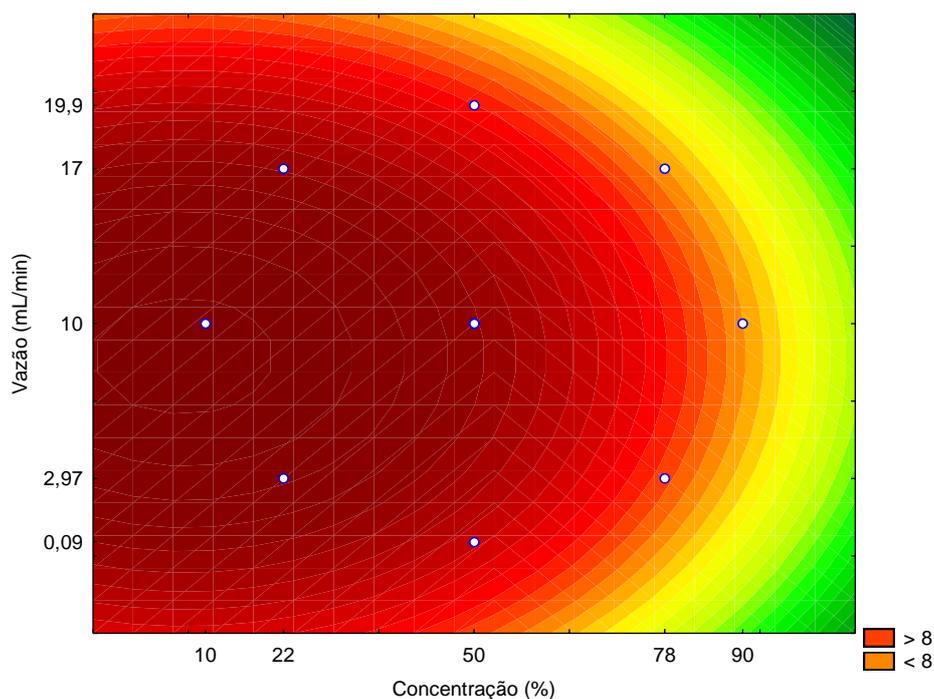


FIGURA 8: Curva de contorno para a R da exo-PG da fase sobrenadante em função da concentração de álcool etílico e vazão de alimentação.

Com relação ao FP da enzima PME fase sobrenadante, os resultados obtidos foram abaixo de 1, mostrando que a enzima deslocou-se para a fase precipitada, como verificado anteriormente.

Considerando a R da enzima PME na fase sobrenadante, a Figura 9 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados. O efeito linear da concentração do álcool e a interação entre a vazão da reação e a concentração apresentaram efeitos significativos negativos em relação a R da enzima na fase sobrenadante. A máxima recuperação (83,3 %) foi obtida com uma concentração de álcool de 22 % e fluxo de reação de 17 mL/min para PME.

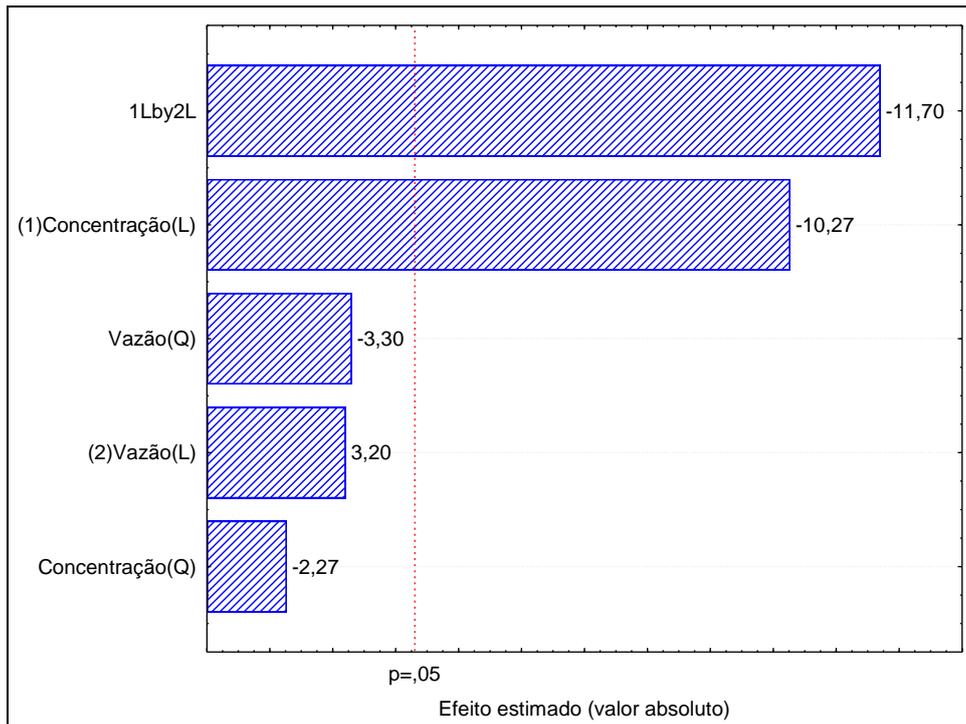


FIGURA 9: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$ , em relação a R da enzima PME do sobrenadante.

Com relação ao FP da enzima PMGL na fase sobrenadante, a Figura 10 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados. A concentração do álcool, a vazão da reação e a interação entre a vazão da reação e a concentração apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) negativos em relação ao FP da enzima. Fatores de purificação de 1,6 e 1,7 vezes foram obtidos para a PMGL.

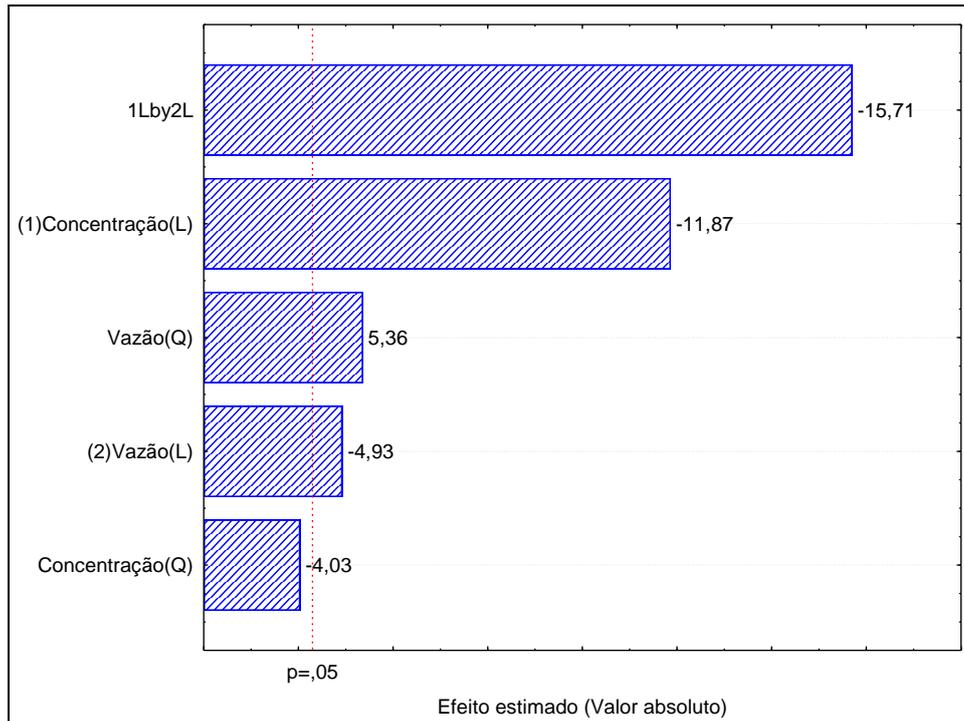


FIGURA 10: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  do sobrenadante, em relação ao FP da enzima PMGL, respectivamente.

Considerando a R da enzima PMGL fase sobrenadante, a Figura 11 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas. A concentração do álcool, a vazão de reação e a interação entre a vazão da reação e a concentração apresentaram efeitos significativos negativos em relação a R da enzima. No entanto, a concentração e a vazão quadrática apresentaram efeitos significativos positivos. Valores de R superiores a 100 %, foram encontrados nos ensaios 2, 3, 5, 7 (Tabela 2).

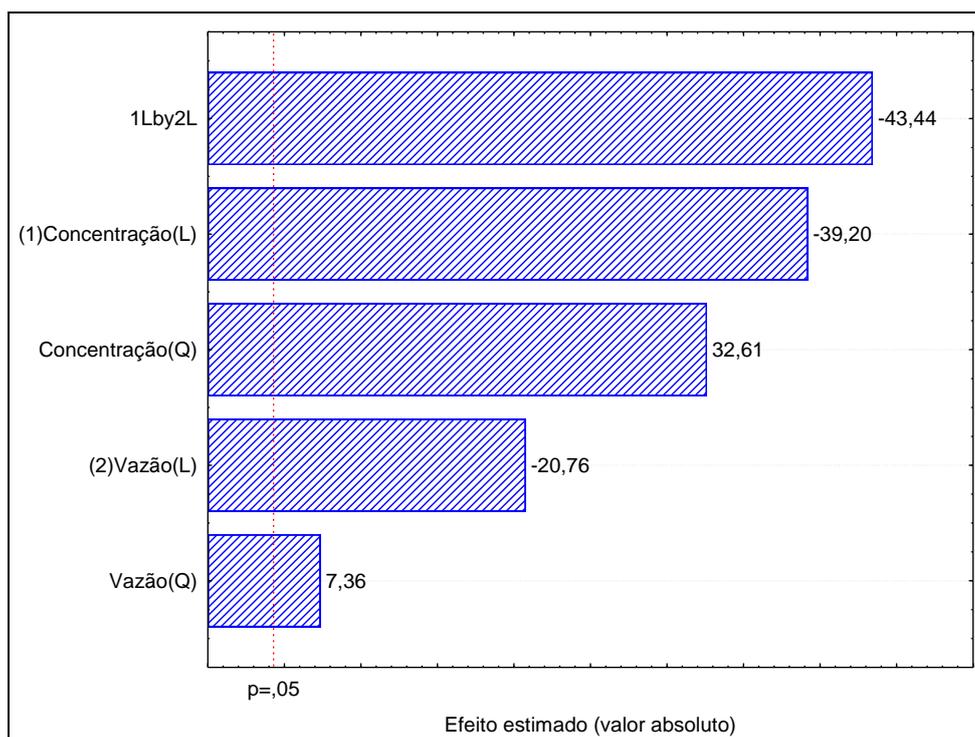


FIGURA 11: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$ , em relação a R da enzima PMGL do sobrenadante.

Cortez & Pessoa Jr. (1999), em experimentos conduzidos com xilanases nas concentrações de etanol de 20 % a 60 %, também observaram que a enzima permaneceu na fase sobrenadante, levando a baixas recuperações no precipitado. No entanto, o aumento da concentração de etanol para 80 % resultou em recuperação de quase 100 % da enzima adicionada. Estes mesmos autores mostraram ainda que a recuperação é muito dependente do pH do meio. Em pH mais baixo (4,6), mesmo com concentração de etanol baixa, maiores níveis de recuperação foram obtidos do que com pH elevados (5,9 a 7,0).

Em outro estudo, Farinas *et al.* (2011) avaliaram a precipitação de endoglucanase e xilanase com etanol nas concentrações de 40 % a 80 % (v/v), sendo que obtiveram recuperações de, no máximo, 40 % da endoglucanase. Os autores atribuem a recuperação à massa molar da enzima, justificando que moléculas maiores têm mais chance de agregação do que proteínas menores.

As baixas recuperações obtidas com solventes podem estar relacionadas com a desnaturação da enzima quando exposta aos solventes, conforme já demonstrado por outros estudos (OOI *et al.*, 2009; CORTEZ & PESSOA JR., 1999).

#### 4.1.2 Precipitação com acetona, álcool isopropílico e álcool n-propílico

Os resultados da precipitação da exo-PG com os solventes em estudo encontram-se nas Tabelas 3 e 4, para o precipitado e sobrenadante, respectivamente. Optou-se, em um primeiro momento, pela não realização do planejamento de experimentos completo, testando-se somente algumas condições para os demais solventes orgânicos

TABELA 3: Fator de purificação e recuperação da exo-PG obtidos na fase precipitada após a precipitação com solventes.

Ensaio	Solvente	Concentração (%)	Vazão (mL/min)	FP*	R*
1	Acetona	56	10	0,05	2,5
2	Acetona	67	3	1,35	55,6
3	Acetona	67	17	1,42	54,4
4	Álcool n-propílico	56	10	0	0,5
5	Álcool n-propílico	56	20	0	4,9
6	Álcool n-propílico	67	3	0	33,4
7	Álcool n-propílico	67	17	0	50,0
8	Álcool n-propílico	67	20	0	9,6
9	Álcool isopropílico	56	10	0	0
10	Álcool isopropílico	56	20	0	0,7
11	Álcool isopropílico	67	3	20,00	56,6
12	Álcool isopropílico	67	17	12,71	39,9
13	Álcool isopropílico	67	20	0	36,1

\*média de três repetições

De acordo com a Tabela 3, em alguns ensaios (1, 4, 5, 8, 9 e 10) a maior recuperação da enzima (40,6 %) foi obtida na fase sobrenadante (Tabela 4), indicando a baixa capacidade de precipitação da proteína nestas condições.

Quando se realizou os balanços de atividade enzimática recuperada nas duas fases, percebe-se que em todos os casos houve grande perda de atividade, sendo que as máximas recuperações totais foram obtidas nos ensaios 2, 3, 7 e 11 (Tabela 3). No entanto, os FP destes ensaios foram baixos, com exceção do ensaio 11, realizado com adição lenta de álcool isopropílico 67 % (v/v), que forneceu cerca de 57 % de

recuperação com FP de 20 no precipitado. Outra condição que também merece destaque foi a do ensaio 12, realizado também com álcool isopropílico 67 % (v/v), com vazão 17 mL/min, fornecendo 40 % de recuperação e FP de 12,7. Este resultado sugere que a recuperação da enzima é sensível à taxa de adição do solvente e que o álcool isopropílico foi o que levou às menores perdas de atividade com ganho na purificação.

TABELA 4: Fator de purificação e recuperação de exo-PG obtidos na fase sobrenadante após a precipitação com solventes.

Ensaio	Solvente	Concentração (%)	Vazão (mL/min)	FP*	R*
1	Acetona	56	10	0,62	20,1
2	Acetona	67	3	0,38	21,2
3	Acetona	67	17	0,25	13,6
4	Álcool n-propílico	56	10	0	30,7
5	Álcool n-propílico	56	20	1,84	33,2
6	Álcool n-propílico	67	3	0	32,1
7	Álcool n-propílico	67	17	0	40,6
8	Álcool n-propílico	67	20	0,49	7,7
9	Álcool isopropílico	56	10	0,32	11,9
10	Álcool isopropílico	56	20	2,03	24,0
11	Álcool isopropílico	67	3	0	21,8
12	Álcool isopropílico	67	17	0	18,2
13	Álcool isopropílico	67	20	0,62	16,8

\*média de três repetições

Em função dos resultados mostrados nas Tabelas 3 e 4, que mostraram ganhos na purificação com o uso de álcool isopropílico, um delineamento experimental foi montado, sendo que as Tabelas 5 e 6 apresentam as matrizes do planejamento fatorial completo  $2^2$ , com os valores codificados (reais), dos ensaios de precipitação com isopropílico e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) das enzimas exo-PG, PME e PMGL na fase precipitado (Tabela 5) e sobrenadante (Tabela 6), respectivamente. Para a avaliação dos efeitos das variáveis estudadas, foi montado um planejamento central composto rotacional (CCRD) com quatro ensaios fatoriais, quatro pontos axiais e um ponto central.

TABELA 5: Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$ , valores codificados (reais) da precipitação com álcool isopropílico fase precipitada e respostas em fator de purificação e recuperação.

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG		PME		PMGL	
	Concentração	Vazão	FP	R	FP	R	FP	R
	(%)	(mL/min)		(%)		(%)		(%)
1	-1 (22)	-1 (3)	0	0	0	0	0	0
2	+1 (78)	-1 (3)	0,16	8,8	0	0	0	0
3	-1 (22)	+1 (17)	0,01	0,9	0,26	22,2	2,54	216,4
4	+1 (78)	+1 (17)	0,28	8,4	1,49	44,4	0	0
5	-1,41 (10)	0 (10)	0	1,8	0	11,1	0	117,6
6	+1,41 (90)	0 (10)	2,08	20,5	7,86	77,8	2,34	73,4
7	0 (50)	-1,41 (0,1)	0,01	1,7	0,14	22,2	0,83	133,2
8	0 (50)	+1,41 (20)	0,29	18,0	0,53	33,3	0,95	59,8
9	0 (50)	0 (10)	0,95	21,8	2,41	55,6	1,21	93,3
10	0 (50)	0 (10)	0,95	21,2	2,69	44,4	1,22	71,3
11	0 (50)	0 (10)	1,18	19,5	3,20	33,3	1,20	81,0

O uso de álcool isopropílico permitiu obter FP de 2,08 (ensaio 6) com R de 20,5 % para a enzima exo-PG na fase precipitada. Observou-se que no intervalo estudado, a concentração e a vazão de reação quadráticas apresentaram efeitos significativos negativos ( $p < 0,10$ ) em relação ao fator de purificação, como pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 12) para enzima exo-PG fase precipitada.

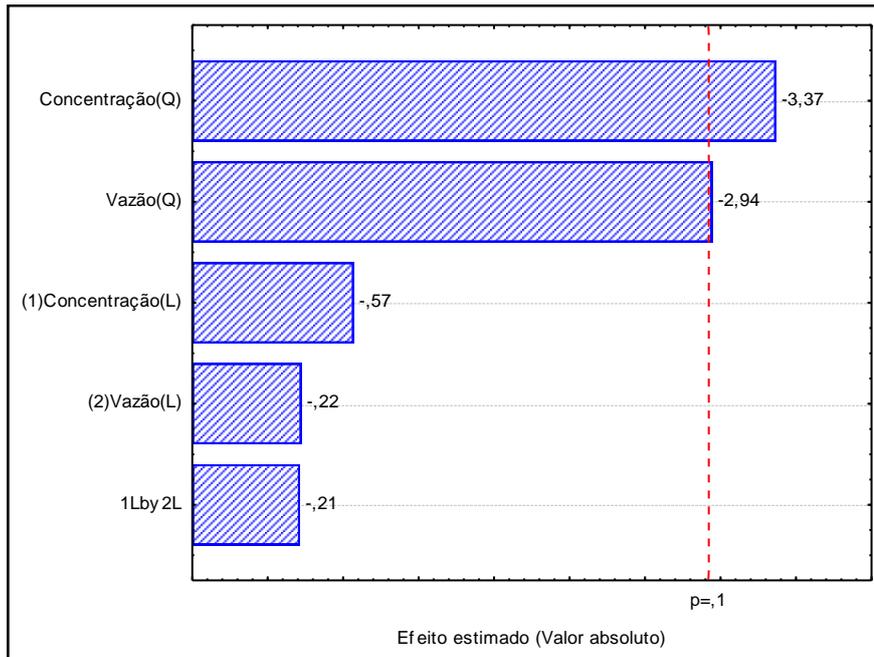


FIGURA 12: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  purificação com álcool isopropílico em relação ao FP da enzima exo-PG da fase precipitada.

Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de  $p$  e  $t(2)$ , para a  $R$  da enzima exo-PG fase precipitada são apresentados no apêndice 1 – Tabela 5. Todas as variáveis apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade da exo-PG na fase precipitada.

Os resultados da análise de variância para  $R$  da enzima exo-PG fase precipitada podem ser visualizados no apêndice 1 - Tabela 6. Pode-se dizer que o modelo codificado de segunda ordem é válido estatisticamente, pois o  $F_{\text{calculado}}$  apresentou-se 1,51 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , e o coeficiente de correlação de 0,91. A Equação 8 apresenta o modelo codificado para a recuperação do planejamento.

$$R = 20,85 + 5,36 \times (C) - 6,37 \times (C)^2 + 2,95 \times (V) - 7,014 \times (V)^2 \quad (8)$$

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

O modelo permitiu a construção da curva de contorno (Figura 13), demonstrando a otimização da recuperação da exo-PG na fase precipitada empregando álcool isopropílico com um ótimo na região próxima a vazão de 10 mL/min e concentração de 50 % de álcool isopropílico.

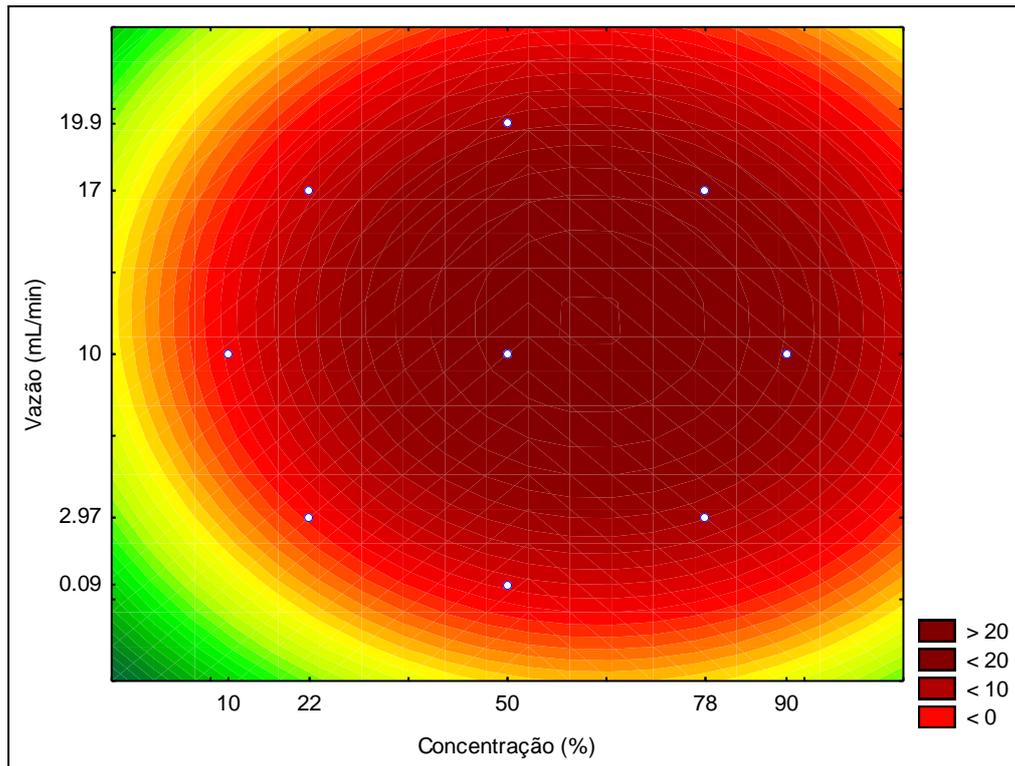


FIGURA 13: Curva de contorno para a R da exo-PG da fase precipitada em função da concentração de álcool isopropílico e vazão de alimentação.

Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para o FP da enzima PME fase precipitada são apresentados no apêndice 1 - Tabela 7. A concentração linear do álcool isopropílico mostrou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) positivo em relação ao FP da enzima PME fase precipitada, enquanto que a vazão de alimentação quadrática mostrou efeito negativo.

A análise de variância (Apêndice 1 - Tabela 8) validou o modelo codificado de segunda ordem (Equação 9), o qual descreve o FP da enzima PME fase precipitada em função das variáveis testadas, o  $F_{\text{calculado}}$  foi 1,67 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com coeficiente de correlação de 0,81. Foi possível construir a curva de contorno para ao FP como mostra a Figura 14, demonstrando que em concentrações do álcool acima de 78 % e vazão de 10 mL/min apresentou-se a região maximizada para o FP (~7,86).

$$FP = 2,77 + 1,54 \times (C) - 1,65 \times (V)^2 \quad (9)$$

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

As variáveis estudadas para a recuperação (máxima 77,8 %) da enzima PME fase precipitada do planejamento em estudo não apresentaram efeito significativo.

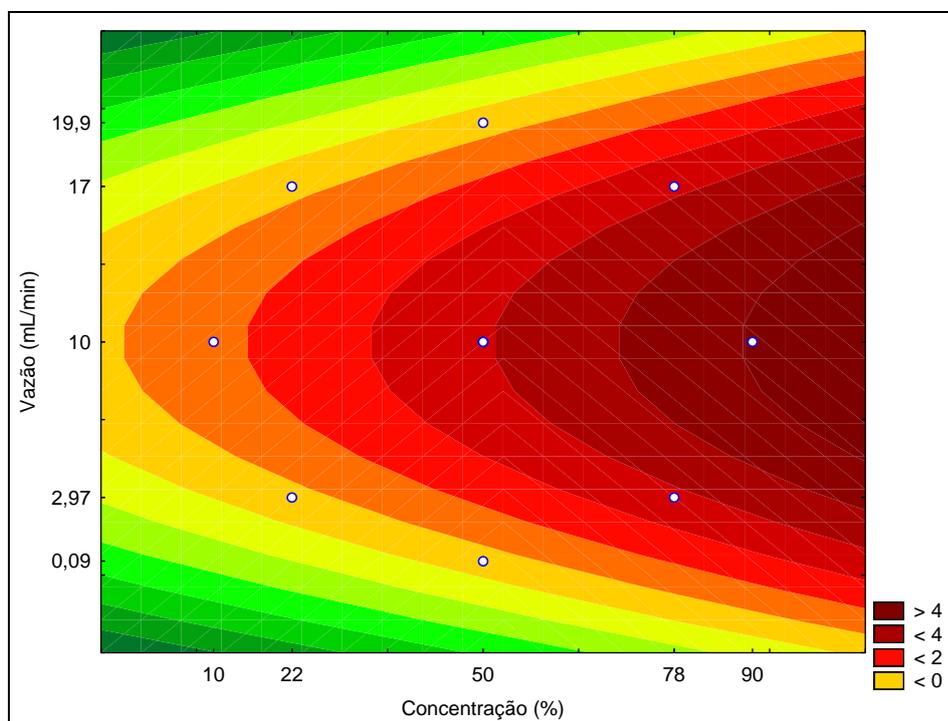


FIGURA 14: Curva de contorno para o FP da enzima PME fase precipitada álcool isopropílico.

Considerando o FP (2,54 e 2,34 vezes) da enzima PMGL fase precipitada, todas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo (Figura 15). No entanto, as variáveis estudadas para R da fase precipitada não foram significativas nas faixas estudadas, recuperações acima de 100 % foram obtidas.

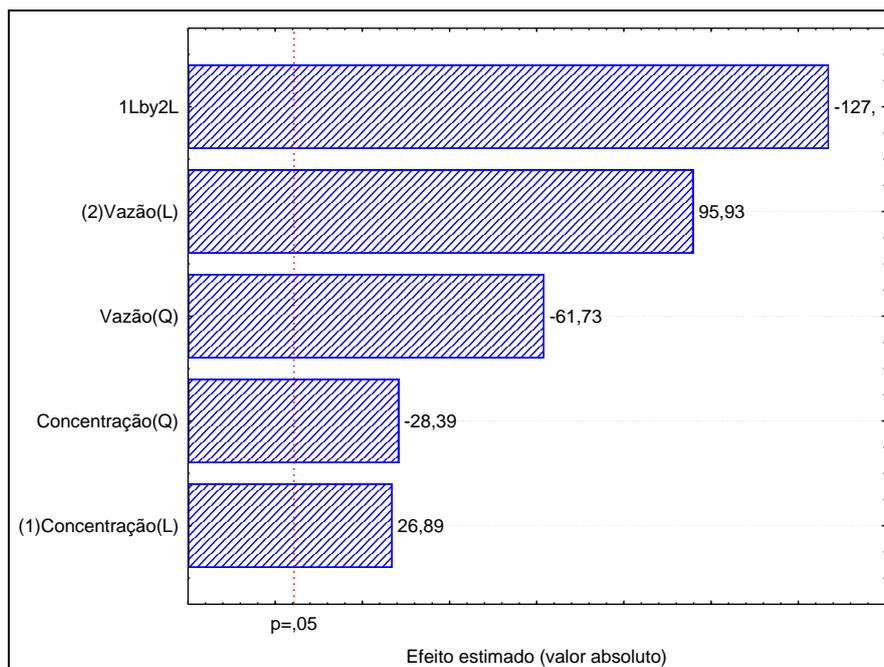


FIGURA 15: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  da fase precipitada álcool isopropílico em relação ao FP da enzima PMGL, respectivamente.

A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$ , com os valores codificados (reais), dos ensaios de precipitação com isopropílico e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da enzima exo-PG, PME e PMGL na fase sobrenadante.

A Tabela 9, do apêndice 1, apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de  $p$  e  $t(2)$ , para o FP da enzima exo-PG fase sobrenadante. Os efeitos linear e quadrático da concentração e o efeito quadrático da vazão mostraram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) negativos em relação ao fator de purificação fase sobrenadante.

O modelo codificado de segunda ordem (Equação 10) foi validado pela análise de variância (Apêndice 1 - Tabela 10), o qual descreve o FP da enzima exo-PG fase sobrenadante em função das variáveis, dentro da faixa estudada. O  $F_{\text{calculado}}$  foi 1,37 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com coeficiente de correlação de 0,90, permitindo a confecção de curva de contorno (Figura 16). Os efeitos que não foram significativos foram adicionadas a falta de ajuste para realização da análise de variância. A Figura 16, demonstra que a utilização de concentrações próximas a 50 % de álcool e vazão de 10 mL/min apresenta-se o máximo de FP (1,12).

TABELA 6: Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$ , valores codificados (reais) da precipitação com álcool isopropílico fase sobrenadante e respostas em fator de purificação e recuperação.

Ensaio	Variáveis Independentes		Exo-PG		PME		PMGL	
	Concentração	Vazão	FP	R	FP	R	FP	R
	(%)	(mL/min)		(%)		(%)		(%)
1	-1 (22)	-1 (3)	0,98	50,9	0	0	2,40	124,4
2	+1 (78)	-1 (3)	0,09	6,0	0	0	0,04	2,7
3	-1 (22)	+1 (17)	0,25	35,3	0,24	33,3	0,83	115,6
4	+1 (78)	+1 (17)	0,04	2,8	0	0	2,04	141,7
5	-1,41 (10)	0 (10)	0,12	14,9	0,69	83,3	0	0
6	+1,41 (90)	0 (10)	0,16	5,6	1,41	50,0	1,87	66,3
7	0 (50)	-1,41 (0,1)	0,09	23,0	0	0	0,47	155,9
8	0 (50)	+1,41 (20)	0,24	14,5	0,46	27,8	4,12	246,1
9	0 (50)	0 (10)	1,00	50,8	0,57	16,7	1,80	270,7
10	0 (50)	0 (10)	1,12	50,4	0,49	22,2	1,80	270,7
11	0 (50)	0 (10)	1,07	45,1	0,33	22,2	2,10	248,3

$$FP = 1,06 - 0,131 \times (C) - 0,416 \times (C)^2 - 0,403 \times (V)^2 + 0,17 \times (C) \times (V) \quad (10)$$

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

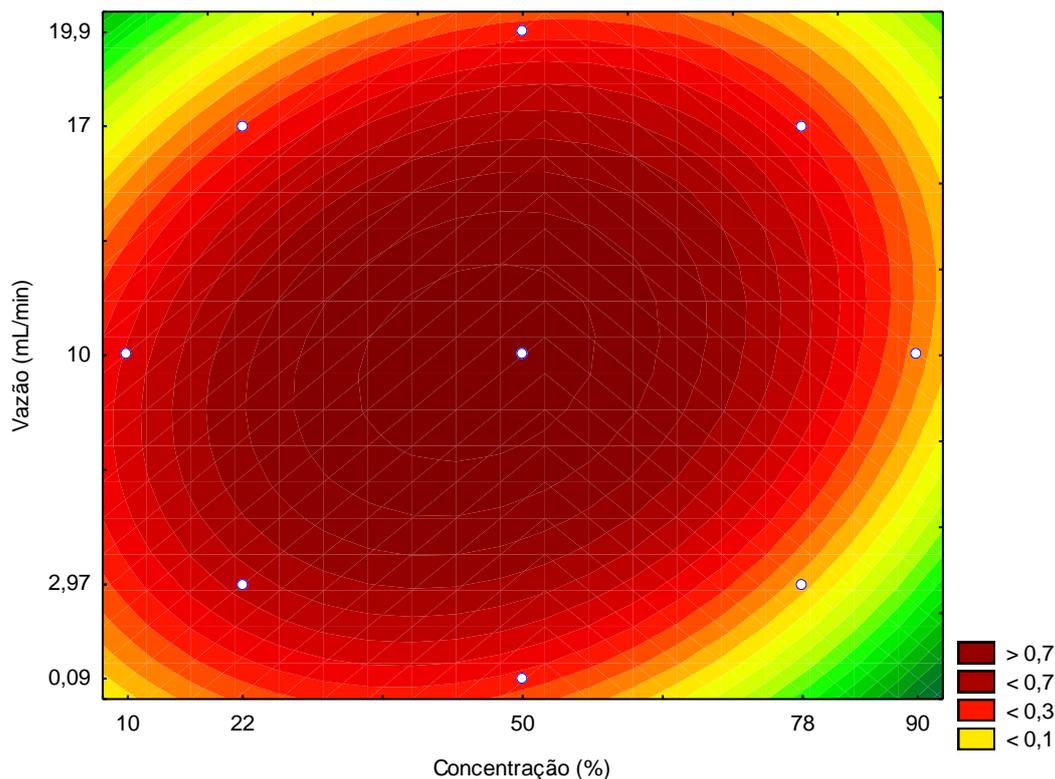


FIGURA 16: Curva de contorno para o FP da enzima exo-PG fase sobrenadante álcool isopropílico.

Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de  $p$  e  $t(2)$ , para a  $R$  da enzima exo-PG fase sobrenadante são apresentados no apêndice 1 - Tabela 11. A concentração e a vazão mostraram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) negativos em relação a recuperação.

A Equação 11 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a  $R$  da enzima exo-PG fase sobrenadante em função das variáveis testadas, dentro da faixa estudada.

$$R = 48,75 - 11,36 \times (C) - 16,97 \times (C)^2 - 12,73 \times (V)^2 \quad (11)$$

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

A análise de variância (Apêndice 1 – Tabela 12), apresenta o  $F_{\text{calculado}}$  que foi 1,85 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com coeficiente de correlação de 0,88, os efeitos que não foram significativos foram adicionados a falta de ajuste. Desta forma, foi possível construir a curva de contorno (Figura 17) para a  $R$ , a qual demonstra que a maximização

da R (~ 50,4 %), encontra-se em regiões próximas de 50 % de álcool e de vazões de 10 mL/min.

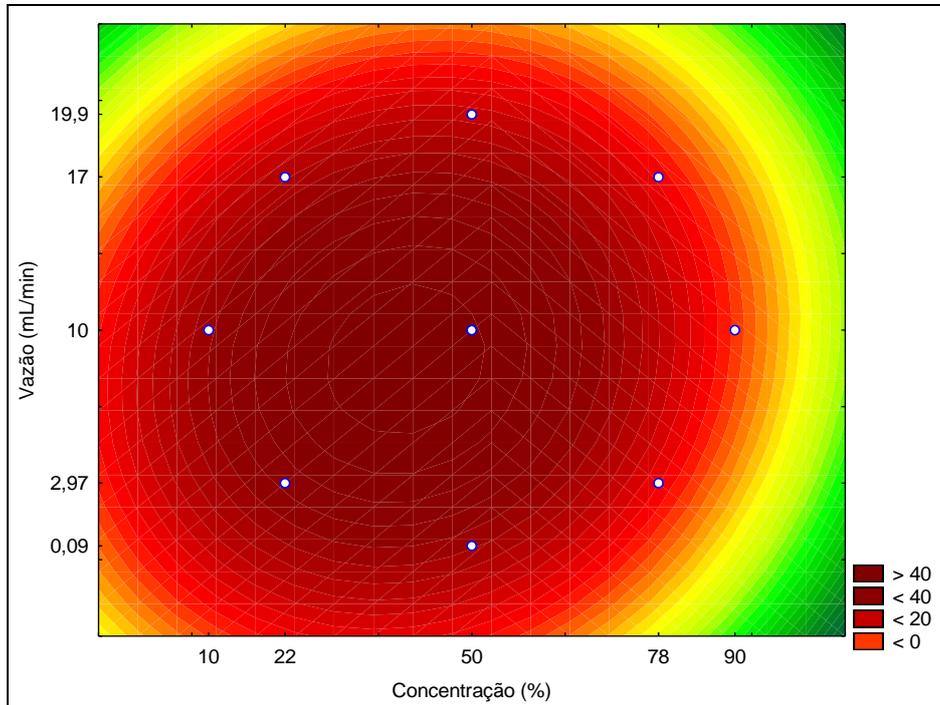


FIGURA 17: Curva de contorno para a R da exo-PG da fase sobrenadante em função da concentração de álcool isopropílico e vazão de alimentação.

As Figuras 18 e 19 apresentam os gráficos de Pareto com os efeitos estimados do FP e R da fase sobrenadante da enzima PME, respectivamente. Apenas a vazão quadrática teve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) negativo em relação ao FP, com o aumento da vazão ocorre a diminuição do FP. No caso da R da enzima todas as variáveis independentes apresentaram efeito significativo (Figura 19) sendo os melhores resultados de FP e R obtidos no ensaio 6 (Tabela 6) com valores de 1,41 e 50 %, respectivamente.

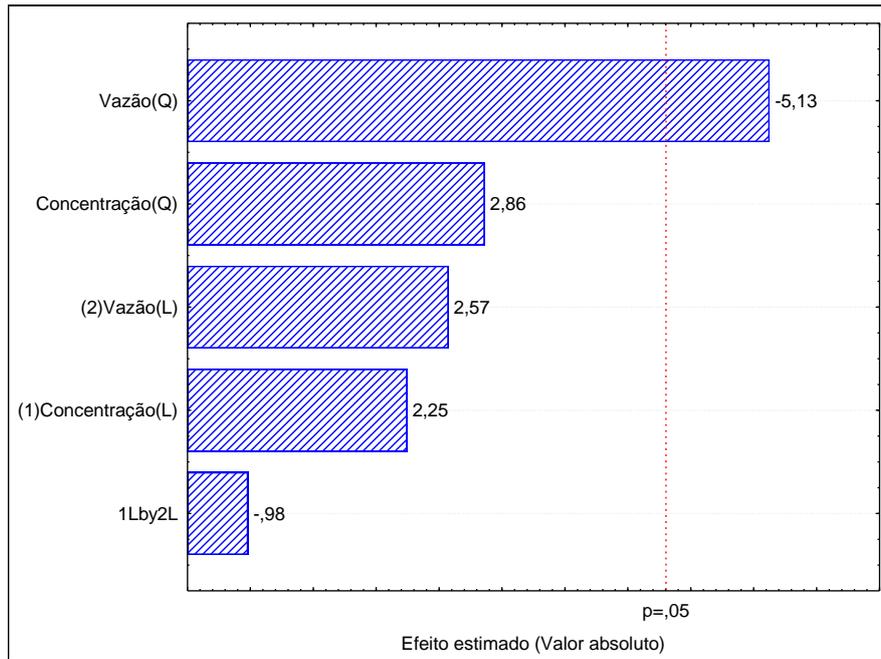


FIGURA 18: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  com álcool isopropílico em relação ao FP da enzima PME da fase sobrenadante.

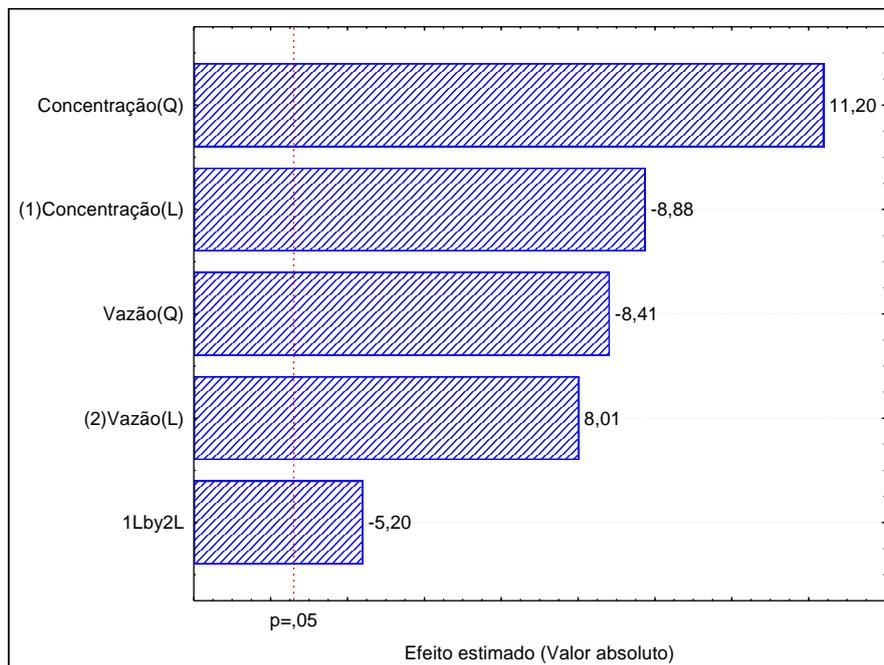


FIGURA 19: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  com álcool isopropílico em relação a R da enzima PME da fase sobrenadante.

A Figura 20 apresenta o gráfico de Pareto para o FP da enzima PMGL na fase sobrenadante. A vazão de reação e a interação da concentração e vazão apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) positivos em relação a variável dependente FP. Os melhores resultados do FP e a R da enzima PMGL da fase sobrenadante foram obtidos no ensaio 8 (Tabela 6) com FP e R de 4,12 e 246,1 %, respectivamente.

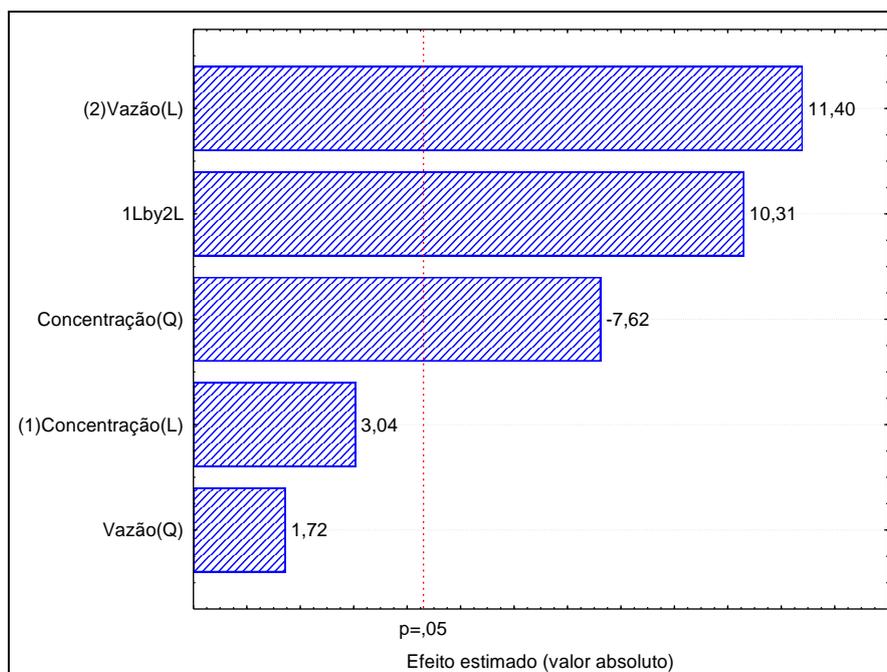


FIGURA 20: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial completo  $2^2$  com álcool isopropílico em relação ao FP da enzima PMGL da fase sobrenadante.

Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de  $p$  e  $t(2)$ , para a R da enzima PMGL fase sobrenadante são apresentados no Apêndice 1 – Tabela 13. A concentração e a vazão quadrática mostraram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) negativos, vazão linear e a interação entre a concentração e vazão apresentaram efeitos positivos em relação a recuperação.

A Equação 12 apresenta o modelo codificado de segunda ordem para a R da enzima PMGL fase sobrenadante, em função das variáveis testadas, dentro da faixa estudada. O modelo foi válido pela análise de variância (Apêndice 1 - Tabela 14), pois o  $F_{\text{calculado}}$  foi 5,62 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com coeficiente de correlação de 0,97. Os fatores que não foram significativos foram adicionados a falta de ajuste. Desta forma, foi possível construir a curva de contorno (Figura 21) para a R, a qual demonstra a

maximização na região próxima a 50 % de álcool e com vazões próximas de 10 mL/min.

$$R = 263,29 - 120,81 \times (C)^2 + 32,255 \times (V) - 36,387 \times (V)^2 + 36,94 \times (C) \times (V) \quad (12)$$

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

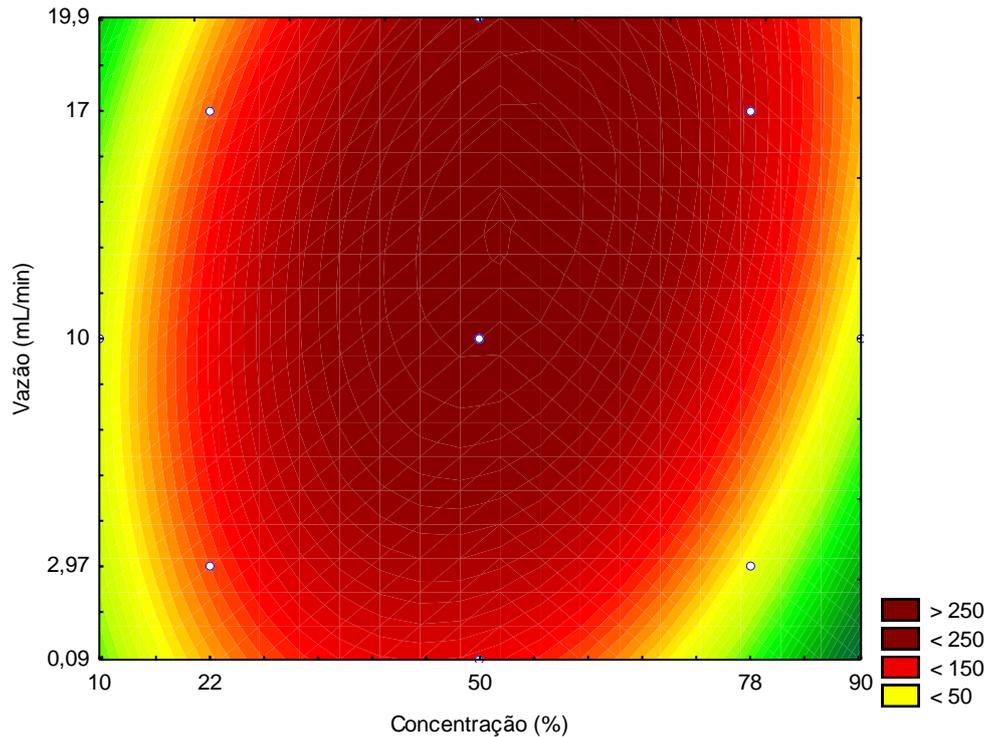


FIGURA 21: Curva de contorno para a R da PMGL da fase sobrenadante em função da concentração de álcool isopropílico e vazão de alimentação.

Os ensaios que obtiveram os melhores resultados do planejamento fatorial completo  $2^2$  utilizando álcool isopropílico (Tabelas 5 e 6) foram realizados em triplicata para validação dos experimentos e avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste t-student de médias. A Tabela 7 apresentam os resultados de FP e R das enzima exo-PG, PME e PMGL, respectivamente.

O ensaio utilizando 50 % de álcool isopropílico apresentou diferença significativa para as enzimas exo-PG e PMGL, sendo o máximo valor encontrado de FP e R, com valores de 1,8 vezes e R de 41,2 % para a enzima exo-PG, com valores otimizados também para a enzima PMGL, FP de 6,0 vezes e R de 150,5 %, ambos na fase sobrenadante. Desta forma, utilizando 50 % de álcool isopropílico numa vazão de

10 mL/min permite obter bons resultados de FP e R para as enzimas em estudo, mostrando que o álcool isopropílico é eficiente na purificação.

Para enzima PME, o ensaio utilizando 50 % de álcool também foi o que apresentou maior FP na fase sobrenadante e maior valor de R foi obtida na fase precipitada.

TABELA 7: Tratamento do extrato enzimático precipitado com álcool isopropílico fase precipitada e sobrenadante das enzimas exo-PG, PME e PMGL.

Concentração de álcool isopropílico (%)**	Exo-PG (Fase precipitada)	
	FP*	R* (%)
90	0,25 <sup>b</sup> ± 0,01	22,0 <sup>b</sup> ± 0,16
50	0,36 <sup>a</sup> ± 0,03	34,5 <sup>a</sup> ± 1,4
	Exo-PG (Fase sobrenadante)	
90	0,18 <sup>b</sup> ± 0,02	9,2 <sup>b</sup> ± 0,67
50	1,8 <sup>a</sup> ± 0,03	41,2 <sup>a</sup> ± 3,2
	PME (Fase precipitada)	
90	0,21 <sup>b</sup> ± 0,04	28,1 <sup>a</sup> ± 0,64
50	0,35 <sup>a</sup> ± 0,07	23,4 <sup>b</sup> ± 1,3
	PME (Fase sobrenadante)	
90	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
50	0,43 <sup>a</sup> ± 0,01	10,9 <sup>a</sup> ± 0,32
	PMGL (Fase precipitada)	
90	1,3 <sup>b</sup> ± 0,12	84,4 <sup>b</sup> ± 2,8
50	1,6 <sup>a</sup> ± 0,14	166,8 <sup>a</sup> ± 8,2
	PMGL (Fase sobrenadante)	
90	0,43 <sup>b</sup> ± 0,07	23,2 <sup>b</sup> ± 2,6
50	6,0 <sup>a</sup> ± 0,4	150,5 <sup>a</sup> ± 3,7

\*Médias seguidas de letras iguais/coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste t-student). \*\*Vazão de alimentação fixada de 10 mL/min.

#### 4.1.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da melhor condição da precipitação com álcool isopropílico

O gel SDS-PAGE das frações da precipitação com álcool isopropílico 50 % e 10 L/min é mostrado na Figura 22. Uma pequena variação no perfil de proteína pode ser observada quando o extrato bruto (coluna 2) em comparação com o tratamento.

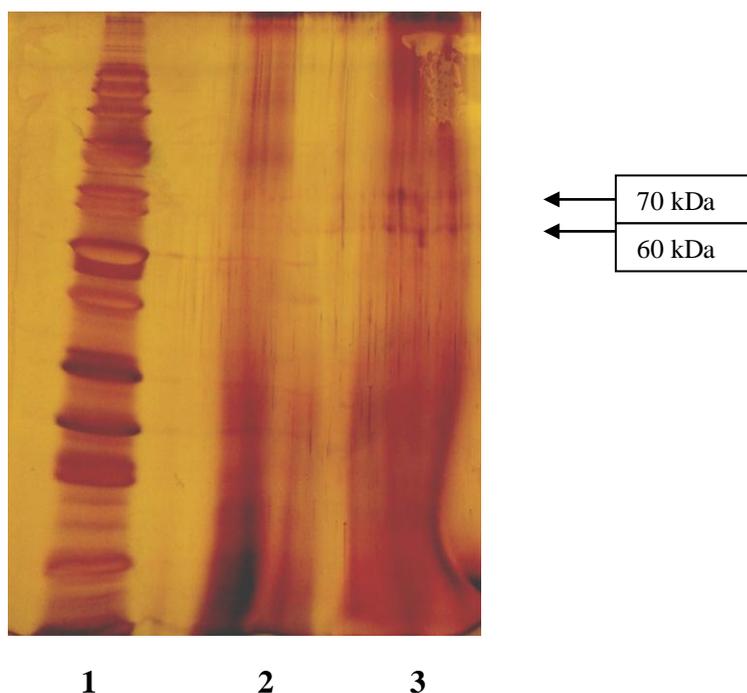


FIGURA 22: SDS-PAGE das diferentes frações do extrato enzimático. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molar (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 and 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto (*Aspergillus niger*). Linha 3: extrato enzimático após precipitação com álcool isopropílico 50 %/10 mL/min.

Kant *et al.* (2013) estudaram a purificação da PG de *Aspergillus niger* MTCC 3323, por precipitação em etanol 60 % e cromatografia com filtração em gel, a análise SDS-PAGE resultou em uma massa molar de 69 e 34 kDa, resultados próximo aos encontrados na presente tese que foram de 70 e 60 kDa.

Em estudo realizado por Perez-Fuentes *et al.* (2014), considerando a caracterização da pectina liase deduziram a partir do gel uma massa molar de 45 kDa na análise SDS-PAGE.

O estudo de uma pectinase comercial foi realizado por Pimentel (2010), a caracterização quanto a sua atividade em diferentes tempos de incubação, e na presença de diferentes agentes químicos utilizados na etapa de purga do beneficiamento têxtil, a massa molecular foi determinada por eletroforese desnaturante SDS-PAGE em gel homogêneo com 12,5 % de poliácridamida, apresentou valor de 32,4 kDa.

O método estudado por precipitação com álcool (etílico e isopropílico) foi eficiente na concentração e purificação das enzimas pectinases, mantendo um elevado nível de atividade das enzimas. Os resultados mostraram que estes métodos são

possíveis de utilização em processos industriais como alternativas para a concentração e purificação das enzimas pectinases.

#### 4.2 Purificação de pectinases com sistemas aquosos bifásicos (SAB)

##### 4.2.1 “Screening” de diferentes condições do SAB - Álcool/Sal

Os resultados obtidos (Tabela 8) mostraram que o uso de álcool e citrato de sódio obteve uma boa purificação da enzima exo-poligalacturonase com o sistema aquoso bifásico, álcool e sal. Os ensaios 3, 6 e 9 apresentaram na fase fundo fator de purificação de 3,4, 4,4 e 4,6 vezes.

TABELA 8: Fator de purificação e recuperação da exo-PG empregando sistema aquoso bifásico sal e álcool fase de fundo.

Ensaio	Sistema Bifásico	Concentração de Álcool /Sal (% , m/m)	FP	R (%)
1	Etanol/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24/22	0	0
2	Etanol/fosfato de potássio	20/20	0	0
3	Etanol/citrato de sódio	24/22	3,4	11,2
4	n-propílico/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18/20	0	0
5	n-propílico/fosfato de potássio	16/16	0	0
6	n-propílico/citrato de sódio	18/20	4,4	13,5
7	isopropílico/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18/20	0	0
8	isopropílico/fosfato de potássio	16/16	0	0
9	isopropílico/citrato de sódio	18/20	4,6	20,2

Os extratos obtidos nos ensaios 3, 6 e 9, realizados com os álcoois e citrato de sódio foram avaliados quanto à atividade das enzimas exo-PG, PME e PMGL. A enzima PME não apresentou atividade enzimática, possivelmente em função do pH 7. Na Tabela 9, encontram-se os resultados para as enzimas exo-PG, PME e PMGL, respectivamente.

Os maiores valores de FP e R foram obtidos na fase de fundo (Tabela 9), rica em sal, para a enzima exo-PG, com FP de 4,8 e R de 20,4 %, utilizando álcool isopropílico

e citrato. Para enzima PMGL foi possível obter FP de 2,2 vezes com R de no máximo 11,2 %, na fase de fundo.

TABELA 9: Tratamento do extrato enzimático com SAB sal e álcool fase de topo e fundo enzima exo-PG, PME e PMGL.

Tratamento - concentração Álcool/sal	Exo-PG (Fase de topo)	
	FP*	R%*
Etanol/Citrato – 24/22	0 <sup>b</sup> ± 0	5,7 <sup>a</sup> ± 0,45
n-Propílico/Citrato- 18/20	0,08 <sup>b</sup> ± 0,01	0,32 <sup>c</sup> ± 0,02
Isopropílico/Citrato – 18/20	0,73 <sup>a</sup> ± 0,09	1,7 <sup>b</sup> ± 0,12
	Exo-PG (Fase de fundo)	
Etanol/Citrato – 24/22	3,4 <sup>b</sup> ± 0,05	20,9 <sup>a</sup> ± 1,4
n-Propílico/Citrato- 18/20	2,6 <sup>c</sup> ± 0,001	18,7 <sup>a</sup> ± 1,6
Isopropílico/Citrato – 18/20	4,8 <sup>a</sup> ± 0,44	20,4 <sup>a</sup> ± 0,30
	PME (Fase de topo)	
Etanol/Citrato – 24/22	0	0
n-Propílico/Citrato- 18/20	0	0
Isopropílico/Citrato – 18/20	0	0
	PME (Fase de fundo)	
Etanol/Citrato – 24/22	0	0
n-Propílico/Citrato- 18/20	0	0
Isopropílico/Citrato – 18/20	0	0
	PMGL (Fase de topo)	
Etanol/Citrato – 24/22	0 <sup>c</sup> ± 0	3,0 <sup>a</sup> ± 0,17
n-Propílico/Citrato- 18/20	1,6 <sup>b</sup> ± 0,06	6,7 <sup>b</sup> ± 0,66
Isopropílico/Citrato – 18/20	2,0 <sup>a</sup> ± 0,20	4,2 <sup>c</sup> ± 0,09
	PMGL (Fase de fundo)	
Etanol/Citrato – 24/22	2,2 <sup>a</sup> ± 0,20	11,2 <sup>a</sup> ± 0
n-Propílico/Citrato- 18/20	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
Isopropílico/Citrato – 18/20	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0

\*Médias seguidas de letras iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste Tukey).

Ooi *et al.* (2009) relatam que o sistema aquoso (álcool/sal) pode inativar ou desnaturar as enzimas pela incompatibilidade com a fase orgânica. Estes autores estudaram a purificação da lipase obtida do micro-organismo *Burkholderia pseudomallei* através de sistema de duas fases álcool/sal, 16 % (m/m) 2-propanol e 16 % (m/m) fosfato, na presença de 4,5 % (m/v) de NaCl. Obtiveram uma eficiência de partição ótima para a purificação da lipase, apresentando um fator de purificação de 13,5 e um rendimento de 99 %.

As Tabelas 10 e 11 apresentam as matrizes do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com os valores codificados (reais), dos ensaios de SAB com álcool isopropílico e citrato de

sódio e as respostas em termos de fator de purificação (FP) e recuperação (R) das enzimas exo-PG, PME e PMGL da fase de topo (Tabela 10) e fase de fundo (Tabela 11).

TABELA 10: Matriz do planejamento fatorial  $2^2$ , valores codificados (reais) para a purificação com sistema aquoso bifásico sal (Citrato de Sódio) e álcool isopropílico (fase de topo) e respostas em termos de FP e R das pectinases (exo-PG, PME e PMGL).

Ensaio	Variáveis independentes*		Exo-PG				PME			PMGL		
	X <sub>1</sub> (%)	X <sub>2</sub> (%)	R <sub>azão</sub>	K <sub>e</sub>	FP	R	K <sub>e</sub>	FP	R	K <sub>e</sub>	FP	R
			volume			(%)			(%)			(%)
1	-1 (18)	-1 (20)	0,42	0,13	0,28	1,4	0	0,92	4,9	0	2,90	15,0
2	1 (22)	-1 (20)	0,58	0,03	0	1,2	0	0	0	0	0	51,4
3	-1 (18)	1 (24)	0,46	0,12	0,56	1,3	0	1,83	5,8	0	0,71	1,9
4	1 (22)	1 (24)	0,58	0,06	0,12	0,5	0	0	0	0	1,68	4,6
5	0 (20)	0 (22)	0,46	0,01	0,71	1,3	0	1,19	5,8	0	1,47	9,6
6	0 (20)	0 (22)	0,46	0,05	0,62	0,9	0	0	0	0	0	0
7	0 (20)	0 (22)	0,46	0,05	0,96	1,5	0	0	0	0	0	0

\*Variáveis independentes: X<sub>1</sub>= Concentração de álcool (%); X<sub>2</sub>= Concentração sal (%). Variáveis independentes fixas: extrato enzimático 2%, temperatura ambiente, tempo de reação 15 min.

Para a fase de topo (Tabela 10) os resultados de FP e R para todas as enzimas avaliadas foram baixos. O fator de purificação e a recuperação para enzima exo-PG não foram significativos a nível de 95 %.

Os melhores resultados de FP e R, para a enzima exo-PG foram obtidos nos ensaios 1 e 4, fase de fundo (Tabela 11), com valores de FP de 4,70 e 4,13 e de R de 26,9 (R<sub>azão</sub> volume de 0,42) e 25,9% (R<sub>azão</sub> volume de 0,58) , respectivamente.

TABELA 11: Matriz do planejamento fatorial  $2^2$ , valores codificados (reais) para a purificação com sistema aquoso bifásico sal (Citrato de Sódio) e álcool isopropílico (fase de fundo) e respostas em termos de FP e R das pectinases (exo-PG, PME e PMGL).

Ensaio	Variáveis independentes		Exo-PG		PME		PMGL	
	X <sub>1</sub> (%)	X <sub>2</sub> (%)	FP	R (%)	FP	R (%)	FP	R (%)
1	-1 (18)	-1 (20)	4,70	26,9	0	0	0	0
2	1 (22)	-1 (20)	2,92	29,5	0	0	0	0
3	-1 (18)	1 (24)	3,66	23,2	0	0	0	0
4	1 (22)	1 (24)	4,13	25,9	0	0	0	0
5	0 (20)	0 (22)	1,48	25,9	0	0	0	0
6	0 (20)	0 (22)	1,60	25,4	0	0	0	0
7	0 (20)	0 (22)	1,81	22,9	0	0	0	0

\*Variáveis independentes: X<sub>1</sub>= Concentração de álcool (%); X<sub>2</sub>= Concentração sal (%). Variáveis independentes fixas: extrato enzimático 2 %, temperatura ambiente, tempo de reação 15 min.

O fator de purificação, na fase de fundo para enzima exo-PG apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ), conforme pode ser visto pelo gráfico de Pareto (Figura 23). Verifica-se, também que ocorreu efeito significativo ( $p < 0,05$ ) positivo da interação entre a concentração do álcool e do citrato de sódio, ou seja, aumentando a concentração de ambos ocorre o incremento do fator de purificação da exo-PG fase de fundo. No entanto, em relação a recuperação da enzima as variáveis independentes não apresentaram efeito significativo.

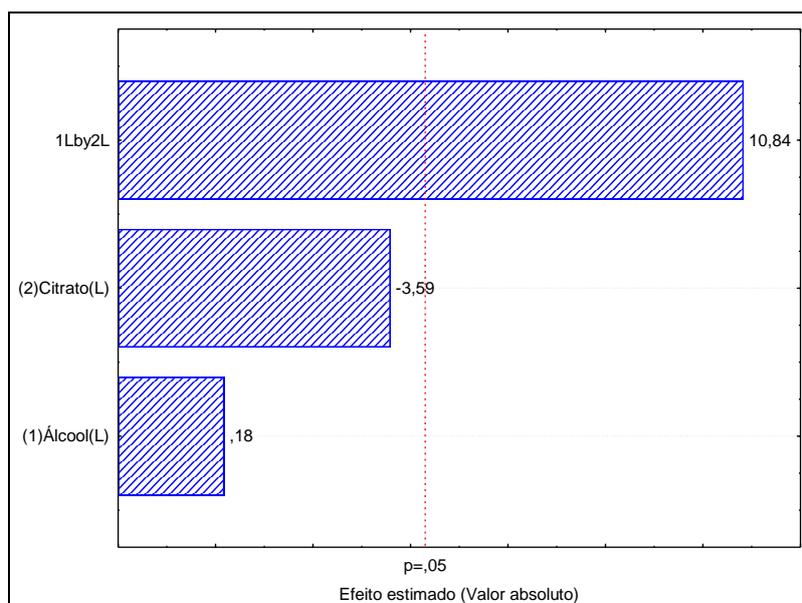


FIGURA 23: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial  $2^2$  empregando SAB álcool isopropílico e citrato de sódio em relação ao FP da enzima exo-PG – fase de fundo.

Para a enzima PMGL, fase de topo, em relação ao FP nenhuma variável apresentou efeito significativo. Porém, a concentração de citrato de sódio apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) negativo em relação a R, demonstrando que ao aumentar a concentração de citrato ocorre diminuição na R (Figura 24). Na fase de fundo em nenhum dos ensaios foi possível obter recuperação das enzimas PMGL e PME. Os resultados para a enzima PME fase de topo não apresentaram efeito significativo.

Amid *et al.* (2013) estudaram a purificação de pectinase, obtida a partir de resíduos de manga, em sistema aquoso bifásico, composto por sal (sulfato de amônio, fosfato de potássio e citrato de sódio) e álcool (etanol, n-propílico e isopropílico), conseguindo fator de purificação (FP) de 11,7 e rendimento (Y %) de 97,1 %, utilizando 19 % (m/m) de etanol e 22 % (m/m) de fosfato de potássio na presença de 5 % de NaCl em pH 7,0.

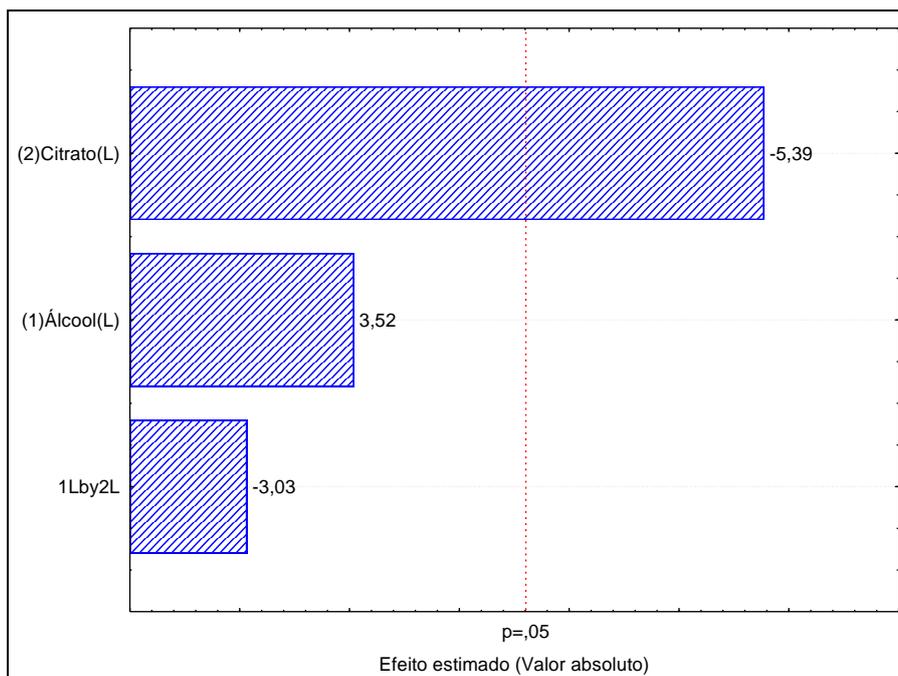


FIGURA 24: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) do planejamento fatorial  $2^2$  empregando SAB álcool isopropílico e citrato de sódio em relação a R da enzima PMGL – fase de topo.

#### 4.2.2 “Screening” de diferentes condições do SAB – PEG/Tampão fosfato de potássio

Para este estudo foram testadas diferentes massas molares de diferentes PEG em pH 6,0 e 7,0 e PEG 6000 em pH 8,0. Foram escolhidos pontos aleatórios baseados em dados relatados por Minami (1997) na curva binodal de cada sistema, conforme apresentado no Anexo I. Os resultados obtidos para o PEG 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 Daltons no pH 6,0 estão apresentados na Tabela 12 e 13.

De acordo com a Tabela 12, os ensaios que conduziram aos melhores resultados da enzima exo-poligalacturonase em relação ao fator de purificação (FP) foram obtidos utilizando-se 16 % de PEG 4000 e 4,8 % (m/v) de NaCl (ensaio 5), e 16 % de PEG 1500 sem NaCl (ensaio 1), ambos na fase de topo, obtendo-se 1,37 e 1,21 vezes e recuperação (R) de 48,8 % ( $R_{\text{azão volume}}$  de 2,71) e 59,3 %, respectivamente, e  $K_e$  de 100.

TABELA 12: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão fosfato de potássio pH 6,0. Dados correspondentes à fase de topo.

Ensaio	PEG (kDa, %)	Tampão (%)	NaCl (%)	R <sub>azão</sub> volume	Exo-PG			PME			PMGL		
					K <sub>e</sub>	FP	R (%)	K <sub>e</sub>	FP	R (%)	K <sub>e</sub>	FP	R (%)
1	1,5 / 16	8	0	0	100	1,21	59,3	0	0	0	100	0,64	31,1
2	1,5 / 16	8	4,8	3,08	100	0,21	7,5	0	0	0	0	0	0
3	1,5 / 28	8	0	5,63	100	0,01	2,6	100	1,05	396,1	0	0	0
4	4 / 16	8	0	0	100	0,19	11,2	0	0	0	0	0	0
5	4 / 16	8	4,8	2,71	100	1,37	48,8	0,02	0,75	26,5	9,72	0,80	28,5
6	4 / 18	10	0	2,38	100	0	13,0	0	0	0	0	0	0
7	6 / 16	8	0	3,50	100	0,12	70,3	0	0	0	0,19	0,05	29,6
8	6 / 16	8	4,8	1,79	100	0,45	27,1	0,98	1,46	88,0	0,03	0,07	6,7
9	6 / 18	10	0	3,08	100	0,09	9,4	100	4,82	478	0	0	0
10	8 / 20	10	0	1,84	100	0,11	12,1	0,11	2,04	220	0	0	0
11	10 / 16	8	0	3,15	100	0,79	65,7	0	0	0	0	0	0
12	10 / 16	8	4,8	2,00	87,75	1,16	38,6	0	0	0	0	0	0
13	10 / 18	10	0	1,94	100	0,30	15,4	0	0	0	100	4,72	241

\* Atividade Inicial: Exo-PG (86,411 U/mL); PME (1 U/mL); PMGL (0,4052 U/mL)

Em comparação com o estudo realizado por Maciel *et al.* (2014), sobre a purificação da endo e exo-poligalacturonase por SAB, os valores de FP foram de 1,98 para a exo-PG, este resultado mostra-se acima, mas com Y (R) abaixo, 18 %, mostrando que as condições realizadas neste trabalho foram mais significantes do que as encontradas pelos autores em relação à recuperação da enzima. No caso da enzima endo-PG, os valores para o FP foi de 8,18 e Y de 74 %, utilizando uma concentração de 12,5 % de PEG 8000 g/mol para as enzimas exo e endo-PG.

Em relação à enzima pectinametilesterase (Tabela 12) os melhores resultados foram os obtidos com 18 % PEG 6000 e sem NaCl (ensaio 9), com fator de purificação de 4,82 vezes e recuperação de 478 % ( $R_{\text{azão volume}}$  de 3,08), com coeficiente de partição ( $K_e$ ) de 100, e em PEG 8000 (20 %) e sem NaCl (ensaio 10) com FP de 2,04 e R de 220 % ( $R_{\text{azão volume}}$  de 1,84).

Para a enzima pectina liase (PMGL) obteve-se um FP de 4,72 vezes e um R de 241 % ( $R_{\text{azão volume}}$  de 1,94 e  $K_e$  de 100) em PEG 10000 (18 %) e sem NaCl (ensaio 13).

Os ensaios realizados em pH 8,0 não apresentaram fator de purificação e recuperação, com perda total da atividade da enzima neste pH estudado. Segundo Gomes *et al.* (2011) o pH ótimo da enzima exo-poligalacturonase é pH 5,5. Sendo o pH 7,0 menos indicado para uma aplicação onde deseja-se uma maior estabilidade da enzima.

Segundo Sharma *et al.* (2001), o efeito do pH está relacionado à estabilidade da enzima e à carga líquida da proteína.

Para a enzima exo-PG na fase de fundo (Tabela 13), todos os ensaios não apresentaram resultados para o fator de purificação e recuperação da enzima. Segundo Rojas *et al.* (2004), o comportamento de partição da proteína depende de sua hidrofobicidade, sendo a fase de topo, rica em PEG, mais hidrofóbica que a fase de fundo, rica em sal.

Os melhores resultados obtidos na fase de fundo para a enzima pectinametilesterase (PME) foram com PEG 10000 e 6000, ambos a 16 %, tampão fosfato 8 %, sem NaCl (ensaio 11 e 7), com valores de 21,6 e 14,05 vezes e R de 396,1 e 201,2 %. Para a enzima pectina liase os melhores resultados de FP foram de 4,76 e 2,34 vezes e R de 13,8 e 142,7 %, obtidos em PEG 1500 e 6000 a 16 %, tampão fosfato a 8 %, ambos em concentração de NaCl de 4,8 % (ensaios 2 e 8).

TABELA 13: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão fosfato de potássio pH 6,0. Dados correspondentes à fase de fundo.

Ensaio	PEG (kDa, %)	Tampão (%)	NaCl (%)	Exo-PG		PME		PMGL	
				FP	R	FP	R	FP	R
					(%)		(%)		(%)
1	1,5 / 16	8	0	0	0	0	0	0	0
2	1,5 / 16	8	4,8	0	0	0	0	4,76	13,8
3	1,5 / 28	8	0	0	0	0	0	1,24	85,9
4	4 / 16	8	0	0	0	0	0	0	0
5	4 / 16	8	4,8	0	0	11,49	538,0	0,45	21,0
6	4 / 18	10	0	0	0	0	0	0	0
7	6 / 16	8	0	0	0	14,05	201,2	0,33	43,9
8	6 / 16	8	4,8	0	0	1,49	56,2	2,34	142,7
9	6 / 18	10	0	0	0	0	0	0	0
10	8 / 20	10	0	0	0	5,79	394,2	0	0
11	10 / 16	8	0	0	0	21,60	396,1	0	0
12	10 / 16	8	4,8	0	0	4,48	997,7	0,37	83,4
13	10 / 18	10	0	0	0	4,94	509,3	0	0

\* Atividade Inicial: Exo-PG (86,411 U/mL); PME (1 U/mL); PMGL (0,4052 U/mL)

Os melhores resultados em termos de FP e R para as três enzimas foram conduzidos em triplicata, sendo realizados os ensaios 1 e 5 fase de topo para a enzima exo-PG, os ensaios 7 e 11 fase de fundo para a enzima PME, e o ensaio 13 fase de topo para a enzima PMGL, conforme pode ser visto na Tabela 14.

TABELA 14: Fator de purificação e recuperação da enzima exo-PG, PME e PMGL (Fase de topo e fundo) empregando SAB PEG e tampão fosfato de potássio pH 6,0.

Tratamento	Exo-PG (Fase de topo)	
	FP*	R (%)*
1- 16% PEG 1500/8 % fosfato /0% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
2 – 16 % PEG 4000/8 % fosfato /4,8% NaCl	$0,42^a \pm 0,01$	$10,7^b \pm 0,24$
3 -16 % PEG 6000/8 % fosfato /0% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
4 -16 % PEG 1000/8 % fosfato /0% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
5 – 18 % PEG 1000/10 % fosfato /0% NaCl	$0,28^b \pm 0,03$	$15,3^a \pm 0,26$
	Exo-PG (Fase de fundo)	
1- 16% PEG 1500/8 % fosfato /0% NaCl	0	0
2 – 16 % PEG 4000/8 % fosfato /4,8% NaCl	0	0
3 -16 % PEG 6000/8 % fosfato /0% NaCl	0	0
4 -16 % PEG 1000/8 % fosfato /0% NaCl	0	0
5 – 18 % PEG 1000/10 % fosfato /0% NaCl	0	0
	PME (Fase de topo)	
1- 16% PEG 1500/8 % fosfato /0% NaCl	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
2 – 16 % PEG 4000/8 % fosfato /4,8% NaCl	$2,5^a \pm 0,24$	$21,0^a \pm 0,73$
3 -16 % PEG 6000/8 % fosfato /0% NaCl	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
4 -16 % PEG 1000/8 % fosfato /0% NaCl	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
5 – 18 % PEG 1000/10 % fosfato /0% NaCl	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
	PME (Fase de fundo)	
1- 16% PEG 1500/8 % fosfato /0% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
2 – 16 % PEG 4000/8 % fosfato /4,8% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
3 -16 % PEG 6000/8 % fosfato /0% NaCl	$20,5^b \pm 0,87$	$445,2^a \pm 30,2$
4 -16 % PEG 1000/8 % fosfato /0% NaCl	$27,6^a \pm 0,89$	$426,9^a \pm 19,5$
5 – 18 % PEG 1000/10 % fosfato /0% NaCl	$20,3^b \pm 0,95$	$319,4^b \pm 2,5$
	PMGL (Fase de topo)	
1- 16% PEG 1500/8 % fosfato /0% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
2 – 16 % PEG 4000/8 % fosfato /4,8% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
3 -16 % PEG 6000/8 % fosfato /0% NaCl	$0^c \pm 0$	$0^c \pm 0$
4 -16 % PEG 1000/8 % fosfato /0% NaCl	$0,73^b \pm 0,1$	$38,70^b \pm 6,31$
5 – 18 % PEG 1000/10 % fosfato /0% NaCl	$7,44^a \pm 0,01$	$199,53^a \pm 8,16$
	PMGL (Fase de fundo)	
1- 16% PEG 1500/8 % fosfato /0% NaCl	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
2 – 16 % PEG 4000/8 % fosfato /4,8% NaCl	$0,9^a \pm 0,1$	$56,0^a \pm 3,5$
3 -16 % PEG 6000/8 % fosfato /0% NaCl	$0,06^b \pm 0,01$	$1,7^b \pm 0,1$
4 -16 % PEG 1000/8 % fosfato /0% NaCl	$0,1^b \pm 0,01$	$2,2^b \pm 0$
5 – 18 % PEG 1000/10 % fosfato /0% NaCl	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$

\*Médias seguidas de letras iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste Tukey).

O tratamento 2, fase de topo, enzima exo-PG, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras, mesmo com valores de FP e R muito baixos. Na fase de fundo não houve recuperação da enzima exo-PG.

Os melhores resultados para enzima PME foram obtidos na fase de fundo, com FP de 27,6 vezes e R de 426,9 % e FP de 20,5 vezes e R de 445,2 %, utilizando 16 % PEG 10000 e 16 % de PEG 6000, respectivamente. Em relação a R, as triplicatas dos tratamentos 3 e 4, não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Diferença houve quando comparados com os demais ensaios.

O tratamento 5 para enzima PMGL, fase de topo, obteve FP de 7,44 vezes e R de 199,5 %, utilizando 18 % de PEG 10000 e 10 % de fosfato de potássio, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais ensaios.

O sistema aquoso bifásico em estudo mostra ser eficiente na purificação e recuperação da enzima PME e PMGL.

Os resultados em pH 7,0 encontram-se na Tabela 15. Os melhores resultados de fator de purificação (FP) para as enzimas exo-PG e PME foram obtidos utilizando 28 % de PEG 1500 com 8 % de tampão fosfato de potássio (ensaio 1) com valores de FP de 0,95 e R de 67,5 % para enzima exo-PG e FP de 1,97 e R de 140,8 % para a enzima PME. A enzima PMGL não apresentou atividade na fase de topo.

TABELA 15: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão fosfato de potássio pH 7,0. Dados correspondentes a fase de topo.

Ensaio	PEG (kDa, %)	Tampão (%)	Exo-PG		PME		PMGL	
			FP	R (%)	FP	R (%)	FP	R (%)
1	1,5/28	8	0,95	67,5	1,97	140,8	0	0
2	4/18	10	0,33	36,3	0,28	30,8	0	0
3	6/18	10	0,47	33,8	0,49	28,9	0	0
4	10/18	10	0	0	0	0	0	0

A fase de fundo não apresentou atividade para as enzimas exo-PG e PME. A enzima PMGL apresentou um FP de 11,43 vezes e uma R de 232,1 % em PEG 1500 28 % e

tampão fosfato 8 % e FP de 0,98 vezes e R de 106,8 % em PEG 10000 18 % e tampão fosfato 10 %.

Os melhores resultados encontrados por Lima *et al.*, (2002) para os coeficientes de partição (Ke) e recuperação (R) em relação a influencia da massa molar de PEG e NaCl em SAB foram: PEG 400/fosfato com NaCl para a exo-poligalacturonase, Ke 5,35 e R 89,5 %; PEG 600/fosfato para a pectina liase (PMGL), Ke 43,18 e R 98,5 % e para a pectinaesterase Ke 1,51 e R 69,6 %.; PEG 10000/fosfato para a endo-poligalacturonase, Ke 1,35 e R 53,5 %. Os melhores fatores de purificação foram observados na fase superior para os sistemas contendo PEG de alta massa molar e sem NaCl: PEG 6000 para a exo-poligalacturonase, 5,49 vezes, e utilizando PEG 10000 para a endo-poligalacturonase, pectina liase e pectinaesterase, com 16,28, 14,27 e 16,64 vezes, respectivamente.

Antov e Omorjan (2009) avaliaram a viabilidade de modelagem estatística de separação e purificação de pectinases em sistema aquoso bifásico com polietilenoglicol 1000/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, estabelecidas com método de superfície de resposta. As concentrações de polietilenoglicol 1000 e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram selecionados como variáveis independentes para avaliar o seu impacto sobre os parâmetros de particionamento - coeficiente de partição de pectinase, fator de purificação e produção de pectinase. Um FP experimental, de mais de 2,5 vezes foi alcançado, seguido por mais de 90 % de recuperação da enzima pectinase. Os modelos estabelecidos mostraram boa previsão de parâmetros de particionamento, confirmando que o método de superfície de resposta pode ser uma ferramenta útil no *design* de processos que ocorrem no ambiente complexo tais como sistemas aquosos bifásicos.

Antov (2004) estudou o particionamento de endo-pectinase e exo-pectinase, produzida durante o cultivo de *Polyporus squamosus* em um sistema aquoso bifásico, composto de polietilenoglicol 4000 e dextrana bruta, em diferentes valores de pH inicial. A biomassa produzida em todas as fases de cultivo mostrou partição exclusivamente na fase inferior, independentemente do pH usado. O valor máximo de coeficiente de partição de endo-pectinase (2,45) foi obtido no segundo dia de cultivo a um pH inicial de 5,0, e um rendimento máximo da fase superior de 80,2 %. O aumento do pH inicial para 7,0 melhorou o coeficiente de partição de exo-pectinase em cerca de 2,5 vezes, e um rendimento da fase superior de 45 % no terceiro dia de cultivo, em comparação com os parâmetros de partição com menor valor de pH inicial. A endo-pectinase não obteve

partição durante o cultivo em pH inicial 7,0 com *P. squamosus* em sistemas de duas fases aquosas.

O efeito de dois sais inorgânicos, sulfato de amônio e di-hidrogenofosfato de potássio foi estudado por Antov & Pericin (2003), sobre o particionamento de pectinases produzidas por *Polyporus squamosus* em sistemas aquoso bifásico de polietilenoglicol / dextrana bruta (10 %, m/m). A presença de ambos os sais em diferentes concentrações não afetou a partição de biomassa, o crescimento de fungos foi ocorrendo exclusivamente na fase inferior em ambos os meios heterogêneos. Em 30 mmol de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{L}$  no meio bifásico, o coeficiente de partição de endo-pectinase foi de 3,9, e este foi 80 % melhor, em comparação com o obtido no sal em concentração duas vezes menor. O uso de concentrações mais elevadas do sal  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aumentou a atividade total da exo-pectinase produzida, mas não alterou significativamente os seus parâmetros de partição. O aumento da concentração de fosfato estimulou a partição de ambas as enzimas para a fase superior: a 0,2 mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$ , o coeficiente de partição para exo-pectinase foi de cerca de 20 % superior a 0,1 mol/L e a recuperação aumentou de 66,4 para 70 % e um lado de partição de endo-pectinase foi realizada e, conseqüentemente, máxima recuperação na fase superior.

Em outro artigo, publicado por Antov & Pericin (2001), utilizando SAB formado por polietilenoglicol e dextrana, o crescimento fúngico de *Polyporus squamosus* foi restringido à fase inferior deixando a fase superior livre de células. O coeficiente de partição para a endo-pectinase foi 1,52, seguido por uma recuperação da fase superior de 70,86 %. Embora a composição do sistema favoreça à partição de uma maior parte da atividade exo-pectinase para a fase inferior ( $K_{\text{exo}}$  foi de 0,6 e a recuperação na fase superior 48,6 %) a atividade particionada na fase de topo foi igual a produzida no meio de cultivo controle.

Antov *et al.* (2001) estudaram um SAB no cultivo do fungo *Polyporus squamosus* para a produção de pectinase com o açúcar de beterraba de resíduos de extração como fonte de pectina. O crescimento fúngico foi restringido para a fase inferior e as quantidades de biomassa e atividade da exo-pectinase produzida foi superior no cultivo homogêneo. Os coeficientes de partição de endo-pectinase e exo-pectinase foram 4,26 e 2,78, respectivamente. As recuperações de fase de topo na etapa de extração foram cerca de 90 % para ambos as pectinases.

Sharma & Gupta (2001) avaliaram um particionamento trifásico para purificar pectinases de *A. niger* e tomate, por adição de tetra-butanol na presença de sulfato de amônio. Recuperações de 76 % (*A. niger*) e 183 % (tomate) e purificações de 10 vezes (*A. niger*) e 9 vezes (tomate) foram obtidos. A enzima final purificada a partir de tomate mostrou uma única banda em SDS-PAGE com um peso molecular de 46 kDa.

Kavakçioğlu & Tarhan (2013) estudaram o particionamento da catalase em sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol e sal. Os melhores parâmetros de partição foram encontrados no sistema de PEG 1000 18 % -  $K_2HPO_4$  12 % (w/w, pH 8,2), sem adição de sal, com valores do coeficiente de partição da atividade total da catalase ( $K_e$ ) de 10,55 e coeficiente de partição da concentração de proteína total ( $K_p$ ) de 0,21. Neste sistema, o rendimento ( $Y_t$ ) foi de 91,9 %, o fator de purificação (FP) foi aumentado para 5,72 e a recuperação ( $R_t$ ) de 81,9 % na fase superior. Em todos os sistemas investigados a catalase mostrou afinidade pela fase superior.

#### **4.2.3 “Screening” de diferentes condições do SAB – PEG/Tampão citrato de sódio**

As Tabelas 16 e 17 apresentam os resultados da purificação das enzimas pectinases utilizando SAB composto de PEG e tampão citrato de sódio.

O ensaio 5 (Tabelas 16) com 40 % de PEG 6000 e 5 % de tampão citrato foi o que apresentou os melhores resultados em termos de FP e R das enzimas na fase de topo, com valores de FP de 2,38 vezes e R de 100,2 % para exo-PG, FP de 5,66 vezes e R de 238,9 % para enzima PMGL e para a enzima PME FP de 7,85 vezes e R de 331,4, com  $R_{\text{azão volume}}$  de 16.

TABELA 16: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão citrato de sódio pH 5,0. Dados correspondentes a fase de topo.

Ensaio	PEG (kDa, %)	Tampão (%)	R <sub>azão</sub> volume	Exo-PG			PME			PMGL		
				K <sub>e</sub>	FP	R (%)	K <sub>e</sub>	FP	R (%)	K <sub>e</sub>	FP	R (%)
1	1,5/40	10	4,0	10,59	1,05	29,3	4,00	5,89	355,1	0,16	0,54	32,3
2	1,5/25	20	1,37	2,70	0,87	19,5	0	0	0	100	1,07	52,2
3	4/45	10	5,60	3,17	0	37,4	0,90	3,67	724,9	0	0	0
4	4/10	25	0,39	100	1,81	7,7	0,05	4,67	20,0	100	18,31	78,3
5	6/40	5	16	2,82	2,38	100,2	100	7,85	331,4	0,94	5,66	238,9
6	6/20	10	2,5	0,66	0,34	48,5	0	0	0	0,10	0,57	81,8
7	8/30	6	7,75	0,77	0,69	50,3	0	0	0	0	0	0
8	8/5	20	0,24	0,17	0,89	6,0	0	0	0	0	0	0

TABELA 17: Fatores de purificação e recuperação utilizando PEG e tampão citrato de sódio pH 5,0. Dados correspondentes a fase de fundo.

Ensaio	PEG (kDa, %)	Tampão (%)	Exo-PG		PME		PMGL	
			FP	R	FP	R	FP	R
				(%)		(%)		(%)
1	1,5/40	10	0,01	0,69	0,14	22,2	0,34	52,0
2	1,5/25	20	0,30	5,27	70,14	2686,4	0	0
3	4/45	10	0,06	2,11	3,97	144,2	0,09	3,3
4	4/10	25	0	0	8,40	1071,9	0	0
5	6/40	5	0,16	2,22	0	0	1,12	15,9
6	6/20	10	0,40	29,35	0	0	4,63	337,0
7	8/30	6	0,09	8,47	0	0	2,71	263,2
8	8/5	20	0,13	21,55	3,57	352,1	0	0

Os ensaios 2 e 8, fase de fundo, para a enzima PME, apresentaram valores de FP de 70,14 vezes e R de 2686,4 % e 3,57 vezes e R de 352,1 %, respectivamente. Os valores apresentaram-se altos, sugerindo a remoção de inibidores. O ensaio 6, fase de fundo para enzima PMGL, apresentou FP de 4,63 vezes e R de 337 %.

Baseado nisto, os ensaios 1, 2, 5, 6 e 8 foram conduzidos em triplicata, sendo os resultados, para as fases de topo e fundo, apresentados na Tabela 18.

O tratamento 2, fase de topo, para a enzima exo-PG com um FP de 1,5 vezes e R de 65,8 %, apresentou diferença significativa entre as amostras a nível de 95%, utilizando 40 % PEG 1500 e 10 % de citrato de sódio.

Altos fatores de purificação e recuperação foram obtidos para a enzima PME, na fase de fundo. O tratamento 3 apresentou FP de 141,8 vezes e R de 2664,8 %, respectivamente, mostrando diferença significativa entre as amostras a nível de 95 %.

O tratamento 1, para a enzima PMGL, utilizando 40 % PEG 6000 e 5 % de citrato, o FP apresentou diferença significativa entre as amostras na fase de topo, com FP de 5,4 vezes e R de 249,4 %. Na fase de fundo, o tratamento 4, 20 % PEG 6000 e 10 % de citrato, apresentou diferença significativa entre as demais amostras, com valores de FP e R de 7,06 vezes e R de 327,6 %, respectivamente.

TABELA 18: Fator de purificação e recuperação da enzima exo-PG, PME, PMGL (Fase de topo e fundo) empregando SAB PEG e tampão citrato de sódio pH 5,0.

Tratamento	Exo-PG (Fase de topo)	
	FP*	R%*
1 - 40% PEG 6000 /5% citrato	0,97 <sup>b</sup> ± 0,02	39,5 <sup>b</sup> ± 0,84
2 - 40% PEG 1500 /10% citrato	1,5 <sup>a</sup> ± 0,21	65,8 <sup>a</sup> ± 4,2
3 - 25% PEG 1500 /20% citrato	0,34 <sup>c</sup> ± 0,02	30,8 <sup>c</sup> ± 2,7
4 - 20% PEG 6000 /10% citrato	0,35 <sup>c</sup> ± 0,01	65,4 <sup>a</sup> ± 2,7
5 - 5% PEG 8000 /20% citrato	0,50 <sup>c</sup> ± 0,05	7,1 <sup>d</sup> ± 0,43
	Exo-PG (Fase de fundo)	
1 - 40% PEG 6000 /5% citrato	0,55 <sup>a</sup> ± 0,02	7,08 <sup>a</sup> ± 0,64
2 - 40% PEG 1500 /10% citrato	0,06 <sup>b</sup> ± 0,02	1,90 <sup>b</sup> ± 0,01
3 - 25% PEG 1500 /20% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
4 - 20% PEG 6000 /10% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
5 - 5% PEG 8000 /20% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
	PME (Fase de topo)	
1 - 40% PEG 6000 /5% citrato	1,13 <sup>b</sup> ± 0,02	47,34 <sup>c</sup> ± 0
2 - 40% PEG 1500 /10% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
3 - 25% PEG 1500 /20% citrato	11,5 <sup>a</sup> ± 1,43	1018,0 <sup>a</sup> ± 11,9
4 - 20% PEG 6000 /10% citrato	2,8 <sup>b</sup> ± 0,50	377,3 <sup>b</sup> ± 75,5
5 - 5% PEG 8000 /20% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
	PME (Fase de fundo)	
1 - 40% PEG 6000 /5% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
2 - 40% PEG 1500 /10% citrato	18,8 <sup>b</sup> ± 0,1	701,3 <sup>b</sup> ± 8,9
3 - 25% PEG 1500 /20% citrato	141,8 <sup>a</sup> ± 9,3	2664,8 <sup>a</sup> ±
4 - 20% PEG 6000 /10% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
5 - 5% PEG 8000 /20% citrato	3,6 <sup>c</sup> ± 0,02	345,8 <sup>c</sup> ± 6,3
	PMGL (Fase de topo)	
1 - 40% PEG 6000 /5% citrato	5,4 <sup>a</sup> ± 0,5	249,4 <sup>b</sup> ± 12,2
2 - 40% PEG 1500 /10% citrato	0 <sup>d</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
3 - 25% PEG 1500 /20% citrato	3,4 <sup>b</sup> ± 0,06	326,2 <sup>a</sup> ± 13,3
4 - 20% PEG 6000 /10% citrato	0,6 <sup>d</sup> ± 0,03	114,9 <sup>c</sup> ± 5,3
5 - 5% PEG 8000 /20% citrato	1,6 <sup>c</sup> ± 0,42	18,4 <sup>d</sup> ± 0,8
	PMGL (Fase de fundo)	
1 - 40% PEG 6000 /5% citrato	1,0 <sup>b</sup> ± 0,02	15,5 <sup>b</sup> ± 1,9
2 - 40% PEG 1500 /10% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
3 - 25% PEG 1500 /20% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
4 - 20% PEG 6000 /10% citrato	7,1 <sup>a</sup> ± 0,29	327,6 <sup>a</sup> ± 6,1
5 - 5% PEG 8000 /20% citrato	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0

\*Médias seguidas de letras iguais/coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste Tukey).

Os resultados do estudo dos sistemas aquosos bifásicos (PEG/fosfato ou citrato) mostraram que este processo de purificação pode ser utilizado como um método eficiente e atraente para o particionamento e recuperação de pectinases. Distintamente, os resultados mostram que o peso molecular do PEG, a concentração de sal e o pH devem ser considerados como importantes parâmetros para purificação das pectinases. O método SAB pode ser uma técnica benéfica, atraente e econômica para a separação e recuperação de pectinases.

## 5. CONCLUSÕES

A precipitação com álcool (etílico e/ou isopropílico) foi considerada promissora para a concentração e fracionamento de pectinases, com a vantagem de ser um método simples e de baixo custo. Empregando o álcool etílico foi possível obter-se um fator de purificação (FP) de 1,3 vezes e de recuperação (R) de 51,3 % para a exo-PG na fase sobrenadante (50 % de álcool e vazão de alimentação de 10 mL/min). Para a PME e PMGL na fase precipitada, o FP e a R foram de 2,25 vezes e de 77,8 % (78 % e 17 mL/min), 4,76 vezes e de 578,6 % (50 % e 10 mL/min), respectivamente. Na precipitação com álcool isopropílico (90 % e vazão de alimentação de 10 mL/min), os maiores FP e R da PME foram na fase precipitada, com 7,86 vezes e 77,8 %. Para as enzimas exo-PG e PMGL, os melhores FP e R foram na fase sobrenadante com 1,12 e 50,45 % para a exo-PG em concentração de 50 % álcool e 10 mL/min, e 4,12 e 246,07 % para a PMGL em 50 % e vazão de 17 mL/min.

O SAB apresentou-se como um método eficiente de purificar pectinases. A máxima purificação da exo-PG, PME e PMGL (ambos na fase de topo) foram de 2,38, 7,85 e 5,66 vezes e R de 100, 331 e 239 %,  $R_{\text{razão volume}}$  de 16, empregando 40 % de PEG 6000 e 5 % de tampão citrato de sódio, respectivamente.

Os sistemas de concentração e purificação por precipitação com álcool e o sistema aquoso bifásico com PEG e fosfato e/ou citrato podem ser recomendados para uso industrial, pois os métodos mostraram-se eficientes para as três enzimas estudadas. Os processos estudados, além de alcançar boa recuperação e purificação da enzima apresentaram ser de operação simples e de custo relativamente baixo, já que para a precipitação de um litro de enzima com álcool isopropílico e a purificação com SAB, PEG e fosfato a estimativa de custos é de aproximadamente R\$ 150,00 e R\$ 270,00, respectivamente.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Com a experiência adquirida neste trabalho acerca da purificação com SAB e precipitação com solventes orgânicos, pode-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

- a) Estudo da concentração e fracionamento das pectinases utilizando ultrafiltração combinada aos processos de precipitação e SAB;
- b) Avaliação de estratégias de combinação dos processos estudados.
- c) Obtenção do melhor *design* do processo de *downstream* combinando as diferentes técnicas, de precipitação e sistemas aquosos bifásicos, para obter a enzima com a máxima pureza e rendimento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1525–1537, 2011.

AMID, M.; MANAPA, M. Y. A.; MUSTAFA, S. Purification of pectinase from mango (*Mangifera indica* L. cv.Chokanan) waste using an aqueous organic phase system: A potential low cost source of the enzyme. **Journal of Chromatography B**, v. 931, p. 17– 22, 2013.

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**, v. 56, p. 295–300, 2004.

ANTOV, M.; PERICIN, D. Effect of some inorganic salts on the partitioning of pectinase of *Polyporus squamosus* in polyethylene glycol/crude dextran aqueous two-phase system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 151–156, 2003.

ANTOV, M.; PERICIN, D. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 467–472, 2001.

ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; DIMIC, G. R.. Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 83–87, 2001.

ANTOV, M.; OMORJAN, R.. Pectinase partitioning in polyethylene glycol 1000/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system: statistical modeling of the experimental results. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 32, p. 235–240, 2009.

AYERS, W. A.; PAPAVIDAS, G. C.; DIEM, A. F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. **Phytopatol.**, v.56, p.1006-1011, 1966.

BASTOS, S. C. Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries: Condições de cultivo, purificação parcial e caracterização, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras – MG, 2012

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**, 6º edição, Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1114p, 2008.

BING, F.; HONG-ZHI, H.; WEN-BIN, Z; LI-PING, K.; PENG, Z.; YI-XUN, L.; HESHUI, Y.; BIN-QING, H.; YA-YONG, L.; LING-LING, Z.; TAO, Z.; BAI-PING, M. Substrate specificity, purification and identification of a novel pectinase with the specificity of hydrolyzing the  $\alpha$ - 1,4-glycosyl residue in steroidal saponin. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1383–1392, 2010.

BRAIA, M., FERRERO, M., ROCHA, M. V., LOUREIRO, D., TUBIO, G., ROMANINI, D., Bioseparation of papain from *Carica papaya* latex by precipitation of papain–poly (vinyl sulfonate) complexes. **Protein Expression and Purification**, v. 91, p. 91-95, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-drye binding. **Anal. Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, C. P.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. A.; SILVA, L. H. M.; MAFFIA, M. C. Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15) K. **J. Chem. Eng.**, 52, 351-356, 2007.

CARVALHO, P. O. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CASTILHO, L. Recuperação de Pectinases Produzidas por *Aspergillus niger* em Fermentação semi-sólida. **Tese Apresentada ao Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

CASTILHO L. R.; MEDRONHO Ricardo A.; ALVES Tito L. M.. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CELESTINO, S. M. C.; DE FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; DE SOUSA, M. V.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 33–42, 2006.

CHARCOSSET, C. Membrane Processes in Biotechnology: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 482–492, 2006.

CHUMPITAZ, L. D. A. Separação de Proteínas de Soro de Leite de Queijo com Sistema Aquoso Bifásico em Coluna de Discos Rotativos. **Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.

CORTEZ, E. V.; A. PESSOA JR. Xylanase and b-xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 277–283, 1999.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291–302, 2006.

CUI, L.; DU, G., ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of trans- glutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*, **Food Chem.** v. 105, p. 612–618, 2007.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – na example of multi-scale complex system. **China particuology**, v.3(6), p.343-348, 2005.

CUNHA, E. V. C.; AZNAR, M. Liquid-Liquid Equilibrium in Aqueous Two-Phase (Water + PEG 8000 + Salt): Experimental Determination and Thermodynamic Modeling. **Journal Chem. Eng.**, v. 54, p. 3242–3246, 2009.

DAMAK, N.; HADJ-TAIEB, N.; BONNIN, E.; BACHA, A. B.; GARGOURI, A. Purification and biochemical characterization of a novel thermoactive fungal pectate lyase from *Penicillium occitanis*. **Process Biochemistry**, v. 46, 888–893, 2011.

DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6. São Paulo, nov./dez., 2006.

DEMIRDAĞ, R.; ÇOMAKLI, V.; ŞENTÜRK, M.; EKINCI, D.; KÜFREVİOĞLU, Ö. İ.; SUPURAN, C. T. Purification and characterization of carbonic anhydrase from sheep kidney and effects of sulfonamides on enzyme activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 1522–1525, 2013.

DE LEMOS, L. R.; SANTOS, I. J. B.; RODRIGUES, G. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; DE CARVALHO, R. M. M. Phase Compositions of Aqueous Two-Phase Systems Formed by L35 and Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng.**, v. 55, p. 1193–1199, 2010.

DE OLIVEIRA, R. M.; COIMBRA, J. S. R.; FRANCISCO, K. R.; MINIM, L. A.; DA SILVA, L. H. M.; PEREIRA, J. A. M.. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase

Systems Containing Poly(ethylene) Glycol 4000 and Zinc Sulfate at Different Temperatures. **Journal Chem. Eng.** v. 53, p. 919–922, 2008.

FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** v. 28, n. 01, p. 17-26, 2011.

FONTANA, R.C.; POLIDORO, T.A.; SILVEIRA, M.M. Comparison of stirred tank and airlift biorreactors in the production of polygalacturonases by *A. oryzae*. **Bioresource Technology**, 100: p. 4493-4498, 2009.

FOGARTY, W.M., KELLY, C.T. “Pectic enzymes”, In: Fogarty, W.M. (ed.), **Microbial Enzymes and Biotechnology**, chapter 3, London, Applied Science Publishers, 1983.

FREIRE, G. Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. **Tese de doutorado (Doutorado em Bioquímica)**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1996.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnología de las enzimas**. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 1990.

GAINVORS, A.; NEDJAOUM, N.; GOGNIES, S.; MUZART, M.; NEDJMA M.; BELARBI, A. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183 p. 131-135, 2000.

GHOSH, R.; CUI, Z.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v.167, p.47–53, 2000.

GILL, P.K., MANHAS, R.K., SINGH, P., Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigates*, **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 894–902, 2006.

GIOVANE, A.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C.; RAIOLA, A.; D'AVINO, R.; TAMBURRINI, M.; CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L. Pectin methylesterase inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1696, p. 245-252, 2004.

GLATZ, C.E. **Separation Processes in Biotechnology**, Marcel Dekker, New York, 1990.

GOLUNSKI, S.; ASTOLFI, V.; CARNIEL, N.; DE OLIVEIRA D.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, p. 261–265, 2011.

GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, V. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 281-287, 2011.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – review. **Process Biochemistry** v. 38, p. 987–996, 2003.

HAGHTALAB, A. JODA, M. Modification of NRTL-NRF model for computation of liquid–liquid equilibria in aqueous two-phase polymer–salt systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 278, p. 20–26, 2009.

HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 31, n. 3, p. 320-327, 1966.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, Issue 9, p. 2931-2944, 2005.

JOLIE, R. P.; DUVETTER, T.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research** v. 345, p. 2583–2595, 2010.

KANT, S.; VOHRA A.; GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. **Protein Expression and Purification**, v. 87 p. 11–16, 2013.

KAR, S.; RAY, R. C.. Purification, characterization and application of thermostable exo-polygalacturonase from *Streptomyces erumpens* MTCC 7317. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 133–147, 2011, apud, ANGELOVA, M.B. Microbial Pectinases: Application in Horticultural Industries, Microbial Biotechnology in Horticulture, Vol. III (R.C. Ray and O.P. Ward, eds.), **Science Publishers**, Enfield, NH, p. 101-179, 2008, apud, SOARES, M. M. C.; DE SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: Characterization of the polygalacturonase production by *Bacillus* sp. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 299-303, 1999.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KAVAKÇIOĞLU, B.; TARHAN, L. Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 105, p. 8–14, 2013.

KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 21-34, 2013.

KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFER, W.; VRSANSKÀ, M.; WEBER, J.; AGRAVAL, P. B.; NIERSTRASZ, V. A.; GUEBITZ, G. M. Purification and

characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **Journal of Biotechnology** v. 121, p. 390–401, 2006.

KRSTIC, D. M.; ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; HOFLINGER, W.; TEKIC, M.N. The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 10–15, 2007.

LADEIRA, R. I. S.. Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase de *Cylindrocladium pteridis*. **Dissertação de mestrado em Biotecnologia**. Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEMES, A. C. Purificação de  $\beta$ -galactosidase: *design* do processo. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**. Universidade Federal do Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2011.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, Antonio, G. A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 63-68, 2002.

MACIEL, M. H. C.; OTTONI C. A.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; SANTOS, C.; LIMA, N.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C.. Purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria** DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fluid.2014.03.018>

MALDONADO, R. R. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2006.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.693-702, 2004.

MARCOS, J. C.; FONSECA, L.P.; RAMALHO, M.T.; CABRAL, J.M.S. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p.1006-1004, 2002.

MARTINS, J. P.; CARVALHO, C. P.; DA SILVA, L. H. M.; COIMBRA, J. S. R.; DA SILVA, M. C. H.; RODRIGUES, G. D.; MINIM, L. A. Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng.**, v. 53, 238–241, 2008.

MEHRNOUSH, A.; SARKER, Md. Z. I.; MUSTAFA, S.; YAZID, A. M. M.. Direct Purification of Pectinase from Mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) Peel Using a PEG/Salt-Based Aqueous Two Phase System. **Molecules**, v. 16, 8419-8427, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426 - 428, 1959.

MINAMI, M. N. Extração Líquido-Líquido aplicada à separação e purificação da Amiloglicosidase. São Paulo. **Dissertação de Mestrado Engenharia Química**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP, 1997.

MONDAL, K., GUPTA, M.N., ROY, I. Affinity-based strategies for protein purification. **Analytical chemistry**, v. 78, p. 3499-3504, 2006.

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Agroindústria Tropical**, Fortaleza, CE, 2007.

NAKKEERAN, E.; SUBRAMANIAN, R.; UMESH-KUMAR, S. Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, n. 2, p. 101–106, 2010.

NAKKEERAN, E.; SUBRAMANIAN, R. Effect of stirring and pump on membrane processing of *Aspergillus carbonarius* culture broth for polygalacturonase. **Biochemical Engineering Journal**. v. 52, p. 99–103, 2010.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid-Liquid extraction of lipase using aqueous two-phase system. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 295-303, 2011.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083–1087, 2009.

PAN, I. H.; YAO, H. J.; LI, Y. K. Effective extraction and purification of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma koningi* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.196-201, 2001.

PEREZ-FUENTES, C.; RAVANAL, M. C.; EYZAGUIRRE, J. Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* pectin lyase in *Pichia pastoris* and its characterization. **Fungal Biology**. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.04.002

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, São Paulo, SP: Editora Manole, 2005.

PIMENTEL, A. Caracterização de uma pectinase comercial e sua utilização no processo de purga da indústria têxtil. **Dissertação de mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

REETZ, M. T. SIMON, L. M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K. e SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **J. Mol. Catal. B – Enzy.**, v. 4, n. 1, p. 41-45, 2002.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Editora e Gráfica Universitária UFPel. Pelotas, v. 3, 2000.

RIEGEL, R. E.. **Bioquímica**, 3º edição – São Leopoldo: Editora UNISINOS, 548p, 2001.

ROBINSON, D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 1991.

RODRIGUES, G. D.; MINIM, L. A. Liquid–Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly (ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng.**, v. 53, p. 238–241, 2008.

RODRIGUES, S. L. C.; MOREIRA, R. L. S.; CARDOSO, M. H.; MERÇON, F. Avaliação de Parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 98-101, 2003.

ROJAS, E. E. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ZUNIGA, A. D. G.; SARAIVA, S. H.; MINIM, V. P. R. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1751–1759, 2004.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M.. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, jan.-mar. 2010, apud, DE OLIVEIRA, A. N. DE OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia

nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

SANTOS, S. F. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. **Tese de Doutorado em engenharia química**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, Rio Grande do Norte, 2007.

SARUBBO, L. A.; OLIVEIRA, L. A.; PORTO, F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Partition of Proteins in Aqueous Two-phase systems Based on cashew-nut tree gum and Poly(ethylene glycol). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p. 685-691, 2004.

SAKAI, T. Degradation of Pectins, In: Winkelmann, G. (ed.), **Microbial Degradation of Natural Products**, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1992.

SAXENA, A; TRIPATHI, B. P; KUMAR, M; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.145, p.1-22, 2009.

SCHNITZHOFFER, W.; WEBER, H. J.; VRSANSKÁ, M.; BIELY, P.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G. M. Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1739–1747, 2007.

SHANG, Q. K.; LI, W.; JIA, Q.; LI, D. Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p.195-203, 2004.

SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Purification of pectinases by three-phase partitioning. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1625–1627, 2001.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p.627-662, 2001.

SHEN, Z.; MANNING, G.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 209–214, 1999.

SIEIRO, C.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry. In: Valdez, B. **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**, In Tech, p. 201-218, 2012.

SILVA, C. H.; PULS, J.; SOUZA, M. V.; FERREIRA FILHO, E. X.. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures *Aspergillus fumigatus* fresenius. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.152-156, 2000.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; LEITE, R. S. R.; DA SILVA, R.; FERREIRA, V.; GOMES, E. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1237–1243, 2007.

SOARES, P. A. G.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA JR., A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389-395, 2012.

THAKUR, B. R.; SING, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n.1, p. 47-73, 1997.

THAKUR, A.; PAHWA, R.; SINGH, S.; GUPTA, R. Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025, **Enzyme Res.** (2010), <http://dx.doi.org/10.4061/2010/170549>.

TEREFE, N. S.; GAMAGE, M.; VILKHU, K.; SIMONS, L.; MAWSON, R., VERSTEEG, C. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. **Food Chemistry**, v. 117, p. 20–27, 2009.

UENOJO, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VALETTI, N. W., LOMBARDI, J., BOERIS, V., PICÓ, G. Precipitation of chymotrypsin from fresh bovine pancreas using iota-carrageenan. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2570-2574, 2012.

YADAV, S.; SHASTRI, N. V. Partial purification of an extracellular pectin lyase from a strain of *Aspergillus niger*. **Ind. J. Microbiol.** v. 44, p. 201–204, 2004.

YADAV, S.; YADAV, P. K. Y.; YADAV, D; YADAV, K. D. S. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. **Process Biochemistry**, 43, p. 547–552, 2008.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 373– 385, 2011.

YOSHIKAWA, H.; HIRANO, A.; ARAKAWA, T.; SHIRAKI, K.. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 865– 871, 2012.

ZHANG, Y.; LIU, J.. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 909–912, 2010.

ANEXO I – Curvas Binodais para PEG 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 Da em pH 6 e 7.

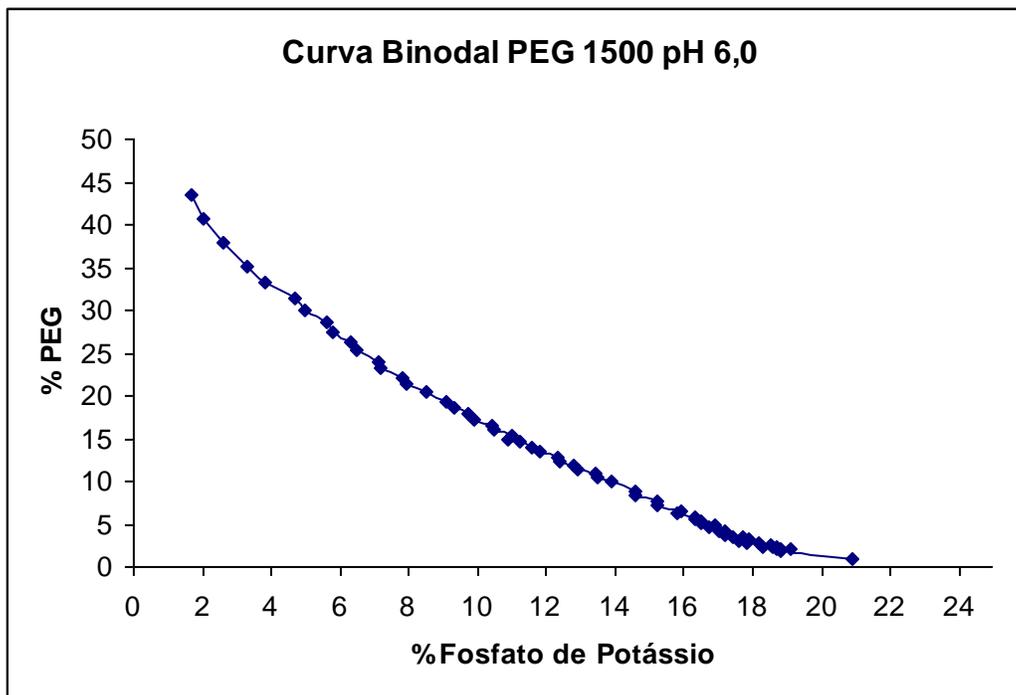


Figura 1: Curva Binodal para o PEG 1500 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6,0.

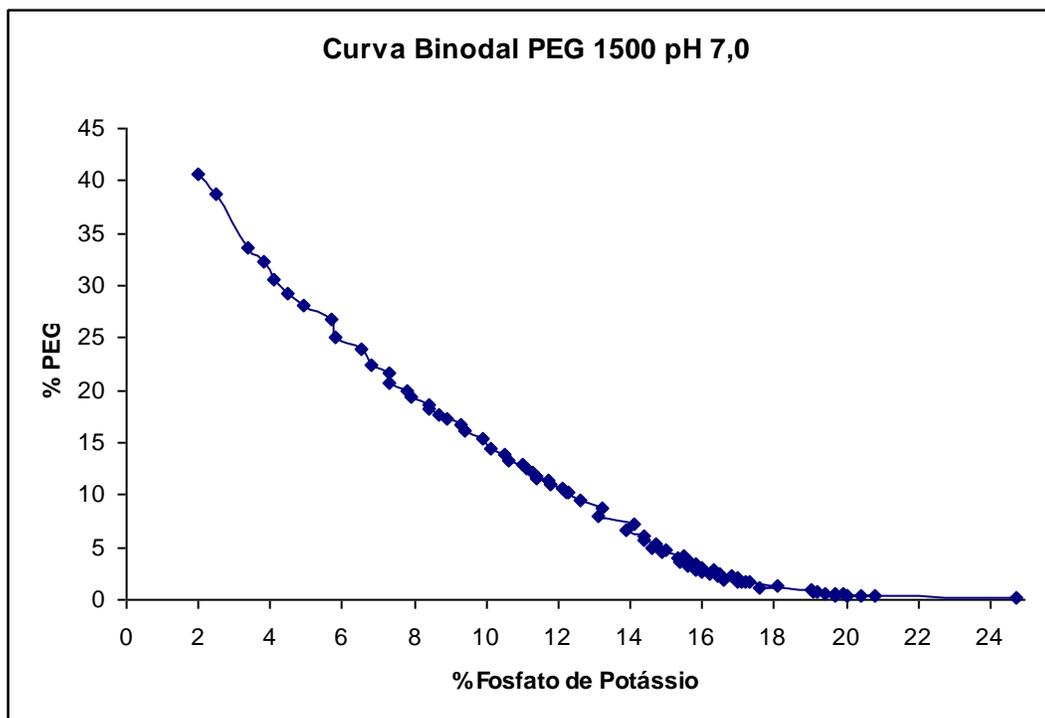


Figura 2: Curva Binodal para o PEG 1500 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7,0.

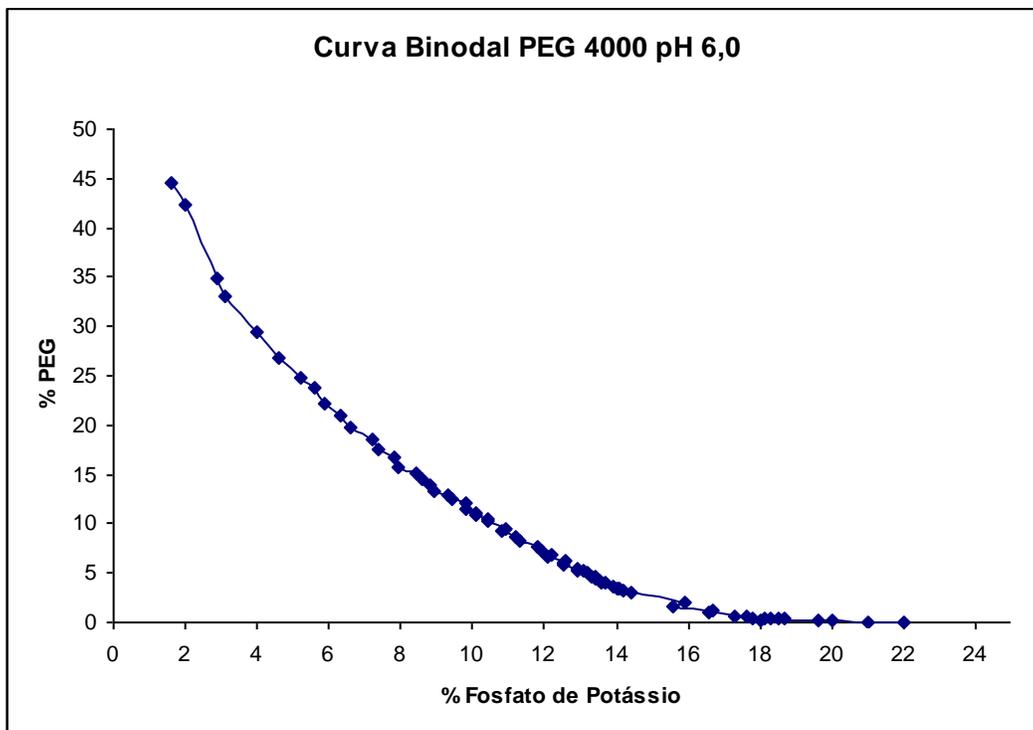


Figura 3: Curva Binodal para o PEG 4000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6,0.

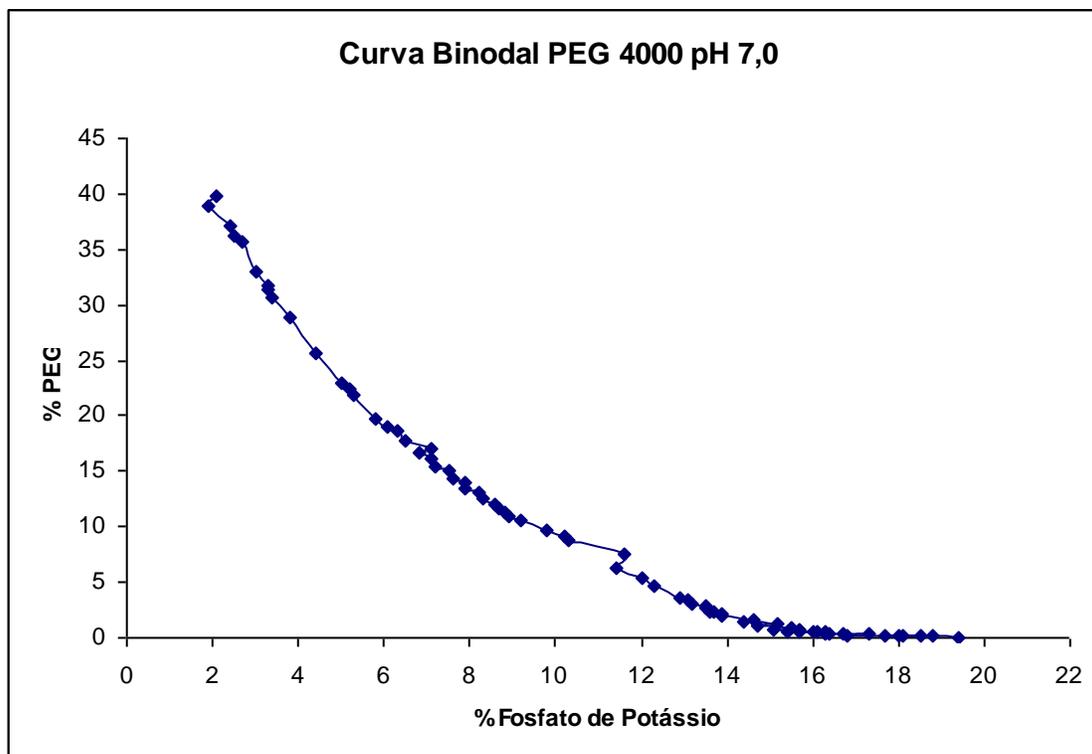


Figura 4: Curva Binodal para o PEG 4000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7,0.

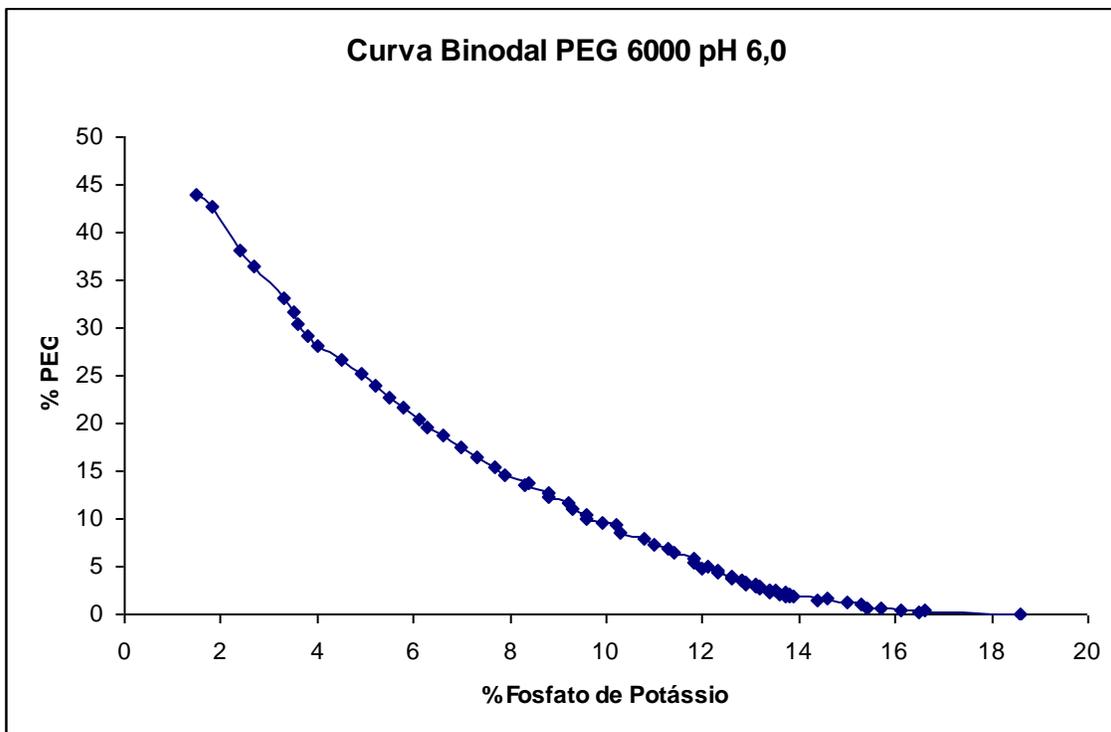


Figura 5: Curva Binodal para o PEG 6000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6,0.

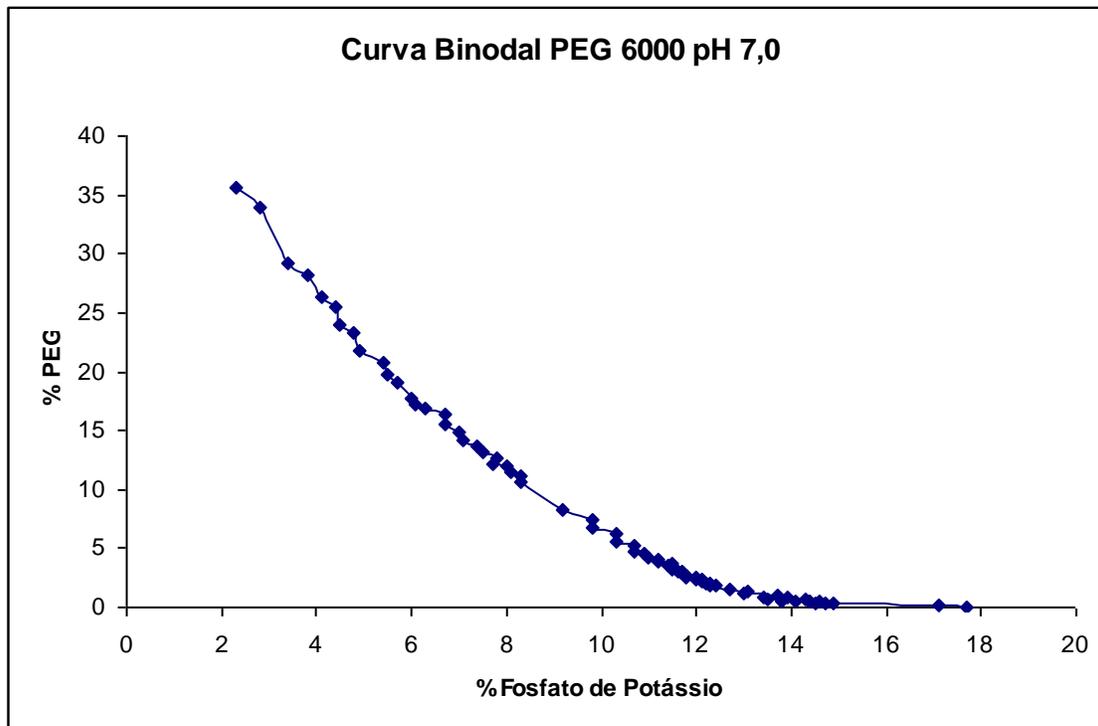


Figura 6: Curva Binodal para o PEG 6000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7,0.

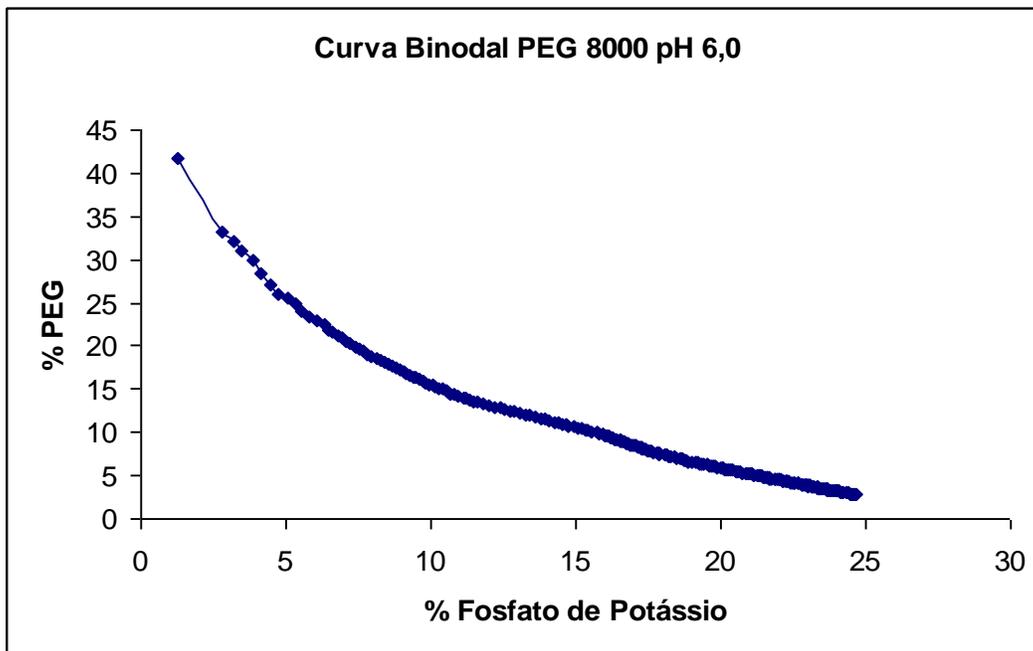


Figura 7: Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.

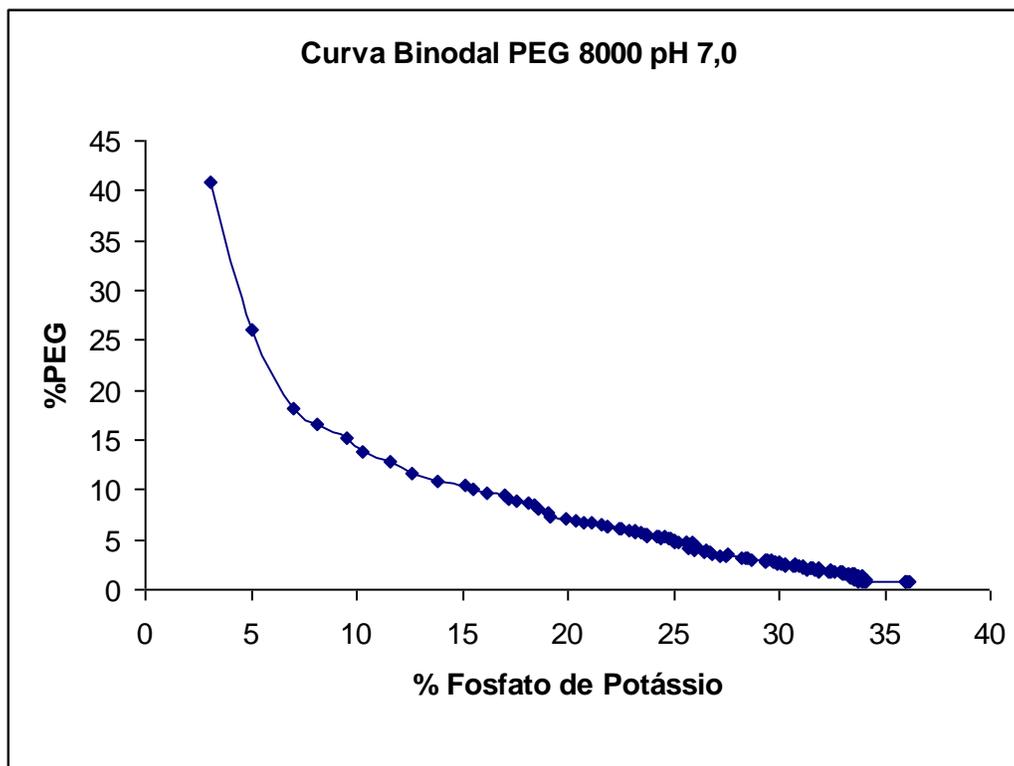


Figura 8: Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7.

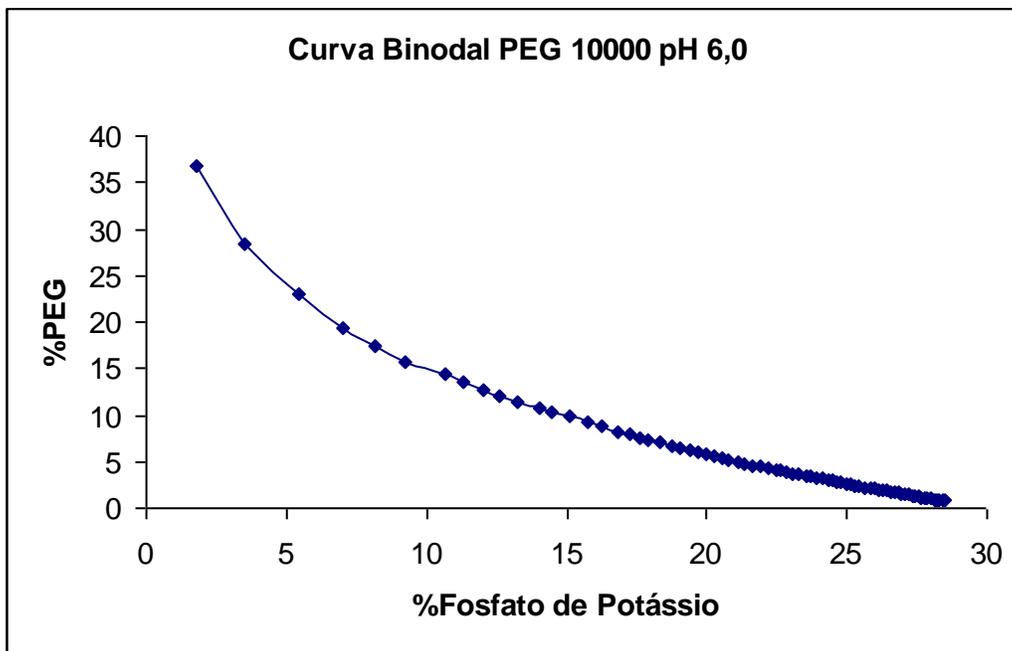


Figura 9: Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.

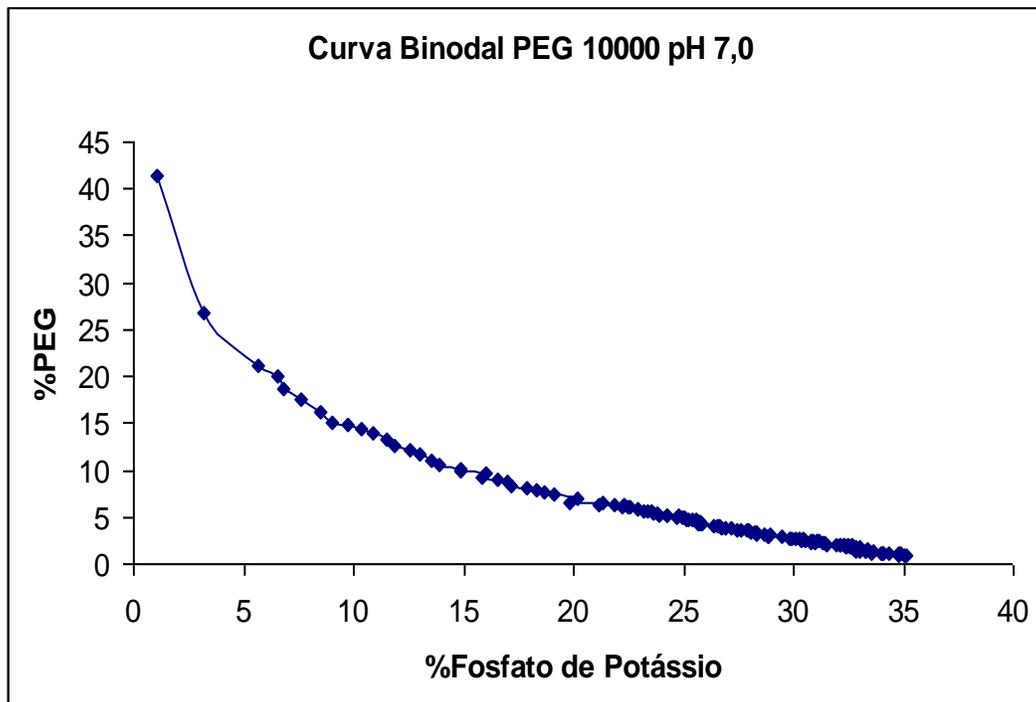


Figura 10: Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7.

## APÊNDICE 1

TABELA 1: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> da recuperação da enzima PME, fase precipitada.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	48,08	1,85	25,95	0,0015
(1)concentração (L)	1,17	1,14	1,03	0,4114
concentração (Q)*	-9,14	1,36	-6,74	0,0213
(2)vazão (L)*	22,05	1,14	19,40	0,0026
Vazão (Q)	-0,061	1,36	-0,045	0,9684
1L . 2L	-6,25	1,60	-3,89	0,0601

Em destaque: fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

TABELA 2: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando a recuperação como resposta para a enzima PME fase precipitada

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	4389,00	2	2194,59	11,37
Resíduo	1544,00	8	192,95	
Falta de ajuste	1522,97	6	53,36	
Erro puro	20,61	2	5,46	
Total	5932,75	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro R=0,86; F<sub>tabelado 2;8</sub> = 4,46

TABELA 3: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> da recuperação da enzima exo-PG, fase sobrenadante.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	48,77	1,46	33,39	0,0009
(1)concentração (L)*	-21,57	0,896	-24,07	0,0017
concentração (Q)*	-7,09	1,07	-6,64	0,0219
(2)vazão (L)*	-4,63	0,896	-5,16	0,0354
vazão (Q)*	-11,03	1,07	-10,32	0,0092
1L . 2L	3,15	1,26	2,49	0,1301

Em destaque: fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

TABELA 4: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando a recuperação como resposta para enzima exo-PG fase sobrenadante

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	4654,00	4	1163,58	34,39
Resíduo	203,00	6	33,84	
Falta de ajuste	190,22	4	53,36	
Erro puro	12,80	2	5,46	
Total	4857,34	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro R=0,98; F<sub>tabelado 4;6</sub> = 4,53TABELA 5: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> da recuperação da enzima exo-PG fase precipitada.

	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média*	20,85	0,714	29,19	0,0012
(1)concentração (L)*	5,36	0,438	12,24	0,0066
concentração (Q)*	-6,37	0,523	-12,19	0,0066
(2)vazão (L)*	2,95	0,438	6,73	0,0213
vazão (Q)*	-7,01	0,523	-13,42	0,0055
1L . 2L	-0,330	0,618	-0,533	0,6470

\*Fatores estatisticamente significativos (p&lt;0,05)

TABELA 6: Análise de variância da recuperação da enzima exo-PG fase precipitada do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	689	4	172,27	6,84
Resíduo	151	6	25,18	
Falta de ajuste	148	4	53,36	
Erro puro	3,06	2	5,46	
Total	840,16	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R=0,91; F<sub>tabelado 4;6</sub> = 4,53

TABELA 7: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> do FP da enzima PME fase precipitada.

	<i>Coeficientes de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	2,77	0,231	11,99	0,0068
(1)concentração (L)*	1,54	0,142	10,88	0,0083
concentração (Q)	0,156	0,169	0,924	0,4528
(2)vazão (L)	0,288	0,142	2,03	0,1790
vazão (Q)*	-1,652	0,169	-9,76	0,0103
1L . 2L	0,307	0,200	1,53	0,2644

\* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

TABELA 8: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando o fator de purificação como resposta da enzima PME fase precipitada

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	37,00	2	18,32	7,47
Resíduo	20,00	8	2,45	
Falta de ajuste	19,30	6		
Erro puro	0,320	2		
Total	56,27	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; R=0,81; F<sub>tabelado 2;8</sub> = 4,46

TABELA 9: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> do FP da enzima exo-PG fase sobrenadante.

	<i>Coeficientes de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	1,06	0,035	30,53	0,0010
(1)concentração (L)*	-0,131	0,021	-6,13	0,0256
concentração (Q)*	-0,415	0,025	-16,31	0,0037
(2)vazão (L)	-0,071	0,021	-3,34	0,0792
vazão (Q)*	-0,403	0,025	-15,82	0,0039
1L . 2L*	0,170	0,030	5,64	0,0300

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

TABELA 10: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando o fator de purificação como resposta da enzima exo-PG fase sobrenadante.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	1,71	4	0,426	6,22
Resíduo	0,411	6	0,068	
Falta de ajuste	0,404	4		
Erro puro	0,007	2		
Total	2,12	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; R=0,90; F<sub>tabelado 4;6</sub> = 4,53TABELA 11: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> da recuperação da enzima exo-PG fase sobrenadante.

	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média*	48,75	1,84	26,48	0,0014
(1)concentração (L)*	-11,36	1,13	-10,06	0,0097
concentração (Q)*	-16,97	1,35	-12,59	0,0062
(2)vazão (L)	-3,85	1,13	-3,41	0,0764
vazão (Q)*	-12,73	1,35	-9,44	0,0110
1L . 2L	3,10	1,59	1,95	0,1910

\*Fatores estatisticamente significativos (p&lt;0,05)

TABELA 12: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando a recuperação como resposta da enzima exo-PG fase sobrenadante.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	3013,00	3	1004,20	8,04
Resíduo	874,00	7	124,89	
Falta de ajuste	853,88	5	53,36	
Erro puro	20,34	2	5,46	
Total	3886,90	10		

R=0,88; F<sub>tabelado 3;7</sub> = 4,35

TABELA 13: Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> da recuperação da enzima PMGL fase sobrenadante.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	263,29	7,47	35,25	0,0008
(1)concentração (L)	-0,269	4,58	-0,059	0,9585
concentração (Q)*	-120,82	5,47	-22,10	0,0020
(2)vazão (L)*	32,25	4,58	7,04	0,0196
Vazão (Q)*	-36,39	5,47	-6,66	0,021834
1L .2L*	36,94	6,47	5,71	0,029327

\*Fatores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )

TABELA 14: Análise de variância para o planejamento fatorial utilizando a recuperação como resposta para enzima PMGL

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	95532,00	4	23883,10	25,50
Resíduo	5619,00	6	936,57	
Falta de ajuste	5284,60	4	53,36	
Erro puro	334,80	2	5,46	
Total	101151,80	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro  $R=0,97$ ;  $F_{\text{tabelado } 4;6} = 4,53$